



PCT
WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁷ : C07K 14/00	A2	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 00/49038 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 24. August 2000 (24.08.00)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE00/00525 (22) Internationales Anmeldedatum: 19. Februar 2000 (19.02.00) (30) Prioritätsdaten: 199 08 752.0 19. Februar 1999 (19.02.99) DE 199 08 766.0 19. Februar 1999 (19.02.99) DE (71)(72) Anmelder und Erfinder: SCHUBERT, Ulrich [DE/DE]; Jenaische Strasse 51, D-07407 Uhlstädt (DE). HENKLEIN, Peter [DE/DE]; Schulze-Boysen-Strasse 25, D-10365 Berlin (DE). WRAY, Victor [GB/DE]; Elbinger Strasse 6, D-38302 Wolfenbüttel (DE). (74) Anwalt: WEHLAN, Helmut; Paul-Gesche-Strasse 1, D-10315 Berlin (DE).		(81) Bestimmungsstaaten: JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Veröffentlicht <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i>
(54) Title: SYNTHETIC PEPTIDE OF REGULATORY VIRUS PROTEIN R (VPR) OF HUMAN IMMUNODEFICIENCY VIRUS TYPE 1 (HIV-1) AND THE UTILIZATION THEREOF (54) Bezeichnung: SYNTHETISCHE PEPTIDE DES REGULATORISCHEN VIRUSPROTEINS R (VPR) DES HUMANEN IMMUNDEFIZIENZVIRUS TYP 1 (HIV-1) UND IHRE VERWENDUNG (57) Abstract <p>The invention relates to synthetic (s) peptides of regulatory virus protein R (Vpr) of human immunodeficiency virus type 1(HIV-1), especially the total chemical synthesis of 96 aminoacid long Vpr protein (sVpr1-96), a 47 aminoacid long N terminal fragment (sVpr1-47) and a 49 aminoacid long C terminal fragment thereof (sVpr48-96) and to fragments sVpr1-20 and sVpr21-40, in addition to other fragments with approximately 15 aminoacids. Said products are used as HIV-1 regulatory proteins in biological assays and in the analysis of molecular structure and physico-chemical properties of Vpr and its domains or in the production of antibodies directed against Vpr-peptide sequences.</p> (57) Zusammenfassung <p>Die Erfindung betrifft synthetische (s) Peptide des regulatorischen Virusproteins R (Vpr) des Humanen Immundefizienzvirus Typ 1 (HIV-1), insbesondere die chemische Totalsynthese des 96 Aminosäuren langen Vpr-Proteins (sVpr1-96), eines 47 Aminosäuren langen N-terminalen (sVpr1-47), eines 49 Aminosäuren langen C-terminalen Fragmentes davon (sVpr48-96) sowie der Fragmente sVpr1-20 und sVpr21-40 und weiterer Fragmente mit etwa 15 Aminosäuren. Als HIV-1-regulatorische Proteine finden die Produkte Verwendung in biologischen Assays, in der Analyse der molekularen Struktur und der physikochemischen Eigenschaften von Vpr und dessen Domänen oder zur Erzeugung von Antikörpern gegen Vpr-Peptidsequenzen.</p>		

BEST AVAILABLE COPY

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

Synthetische Peptide des regulatorischen Virusproteins R (Vpr) des Humanen Immundefizienzvirus Typ 1 (HIV-1) und ihre Verwendung

Beschreibung

5

Die Erfindung betrifft synthetische (s) Peptide des regulatorischen Virusproteins R (Vpr) des Humanen Immundefizienzvirus Typ 1 (HIV-1), insbesondere die chemische Totalsynthese des 96 Aminosäure langen Vpr-Proteins (sVpr1-96) sowie seiner Sequenzen. Als synthetische Vpr-Peptide finden sie Verwendung in biologischen Assays, in der Analyse der molekularen Struktur und den physikochemischen Eigenschaften von Vpr und dessen Domänen sowie zur Erzeugung von Antikörpern gegen Vpr-Peptidsequenzen.

Die bislang einzige *in vitro* charakterisierte biochemische Aktivität von Vpr ist die eines Kationen-selektiven Ionenkanals (Piller *et al.*, 1996, - Literaturverzeichnis am Ende der Ausführungsbeispiele). Diese Arbeiten basierten auf der Annahme, daß die C-terminale alpha Helix (Positionen 46 bis 71 in Vpr), welche Ähnlichkeiten zu der Bienengift-Komponente Melittin besitzt, als Transmembrananker eine Membranpore ausbilden kann. Tatsächlich konnte rekombinantes, in *Escherichia (E.) coli* exprimiertes Vpr in künstlichen planaren Lipidbilayern rekonstituiert werden. Dadurch wurde eine durch -das Membranpotential regulierbare Ionenkanalaktivität ermittelt, deren Regulierbarkeit von der basischen C-terminalen Region abhängt, welche mit der negativ geladenen zytoplasmatischen Seite der Zellmembran in Wechselwirkung treten soll.

Es liegen Hinweise für Homooligomerisierung von Vpr vor: Ein rekombinantes Vpr-Fusionsprotein bildet oligomere Strukturen mit Molekulargewichten von >100 kDa (Zhao *et al.*, 1994b), eine Beobachtung, die bislang an viralen Vpr nicht bestätigt wurde.

Untersuchungen zur molekularen Struktur von Vpr wurden durch zwei Gruppen mittels Sekundärstruktur-Analysen an kurzen Vpr-Peptiden durchgeführt: NMR-Studien an überlappenden Peptiden in wässrigem Trifluorethanol (TFE) sowie in Natriumdodecylsulfat(SDS)-Mizellen identifizierten alpha-helikale Regionen in den Vpr-Positionen 50-82. (Yao *et al.*, 1998). Das Potential zur Helix-Bildung in der C-terminalen als auch der N-terminalen Region von Vpr wurde zuvor von verschiedenen Autoren vorhergesagt (Mahalingam *et al.*, 1995a-d; Yao *et al.*, 1995; Wang *et al.*, 1996b). Neuere Studien mittels CD-Spektroskopie in TFE-haltigen Lösungen an 25 Aminosäure langen Peptiden (Luo *et al.*, 1998) zeigten erste experimentelle Hinweise für die Existenz der N- und C-terminalen Helices in Vpr. Zahlreiche und zum Teil in ihrer Aussage kontroverse Mutationsanalysen haben versucht, die

verschiedenen Primär- und Sekundärstrukturen einzelnen biologischen Aktivitäten von Vpr zuzuordnen (Mahalingam *et al.*, 1995a-d, 1997; Wang *et al.*, 1996a,b; Nie *et al.*, 1998; Di Marzio *et al.*, 1995).

Über die chemische Vollsynthese eines Vpr-Proteins wurde erstmals 1997 von Rocquigny und Mitarbeitern berichtet. Die Autoren beschrieben die Synthese eines 96 Aminosäure großen Peptides, welches von dem Virusisolat HIV-1_{89.6} (Collman *et al.*, 1992) abstammt. Neben den in dieser Arbeit beschriebenen Nachteilen (siehe im weiteren Text) ist dieses Protein in 9 Aminosäurepositionen unterschiedlich zu Vpr von HIV-1_{NL4-3}, dessen Darstellung in der vorliegenden Erfindungsbeschreibung erstmalig berichtet wird. Somit besteht eine 10%-ige Divergenz zwischen den bereits beschriebenen (Rocquigny *et al.*, 1997) und dem in den vorliegenden Verfahren dargestellten Produkten, welche die Gesamt- und Teilsequenzen des Vpr-Proteins von HIV-1_{NL4-3} (Adachi *et al.*, 1986) betreffen.

Rocquigny und Mitarbeitern (1997) geben keine Angaben über die Reinheit sowie die physikochemischen Eigenschaften des Vpr-Peptides an. Es wird lediglich mittels der Far-Westernblot Technik gezeigt, daß SDS-denaturiertes Vpr-Peptid mit dem viralen Nukleoprotein NCp7 des gleichen HIV-1-Isolates in Wechselwirkung tritt. Dieser Befund der NCp7-Vpr-Wechselwirkung konnte bislang von keiner der zahlreichen anderen auf dem Vpr-Gebiet forschenden Gruppen bestätigt werden. Wesentlicher Nachteil dieser Vpr-Synthese ist die Tatsache, daß für dieses Peptid keine der beschriebenen biologischen Aktivitäten durch die Autoren gezeigt wurde. Insbesondere wird gezeigt, daß dieses Vpr-Peptid nicht an p6^{Gag} bindet, eine weithin akzeptierte Eigenschaft von Vpr (Paxton *et al.*, 1993; Lavalley *et al.*, 1994; Kondo *et al.*, 1995; Lu *et al.*, 1995; Kondo und Göttinger, 1996). Darüber hinaus wird beschrieben, daß dieses Peptid keine Oligomeren bildet, und es liegen Hinweise vor, daß dieses Peptid in rein wässrigem System unlöslich ist. Von dem gleichen Labor wird in einer weiteren Studie (Roques *et al.*, 1997) ein Modell der Vpr-NCp7-Wechselwirkung vorgestellt, welches auf Strukturanalysen an Teilsequenzen dieser Peptide basiert. Die Daten dazu werden jedoch in dieser Arbeit oder anderen Veröffentlichungen der Autoren nicht näher beschrieben.

Teilsequenzen von Vpr (Positionen 50-75, 50-82 und 59-86) wurden für NMR-Studien an synthetischen Peptiden eingesetzt (Yao *et al.*, 1998). Eine andere Gruppe hat zwei 25 Aminosäure lange Peptide aus den Bereichen der vorhergesagten alpha-helikalen Domänen in Vpr mittels CD-Spektroskopie untersucht (Luo *et al.*, 1998):

Kurze, ca. 20 Aminosäure lange Peptide der C-terminalen Region von Vpr, welche das Motiv "HF/SRIG" enthalten, haben in einer Konzentration von 0.7 bis 3 micro-M zytotoxische Wirkungen gegenüber verschiedenen Hefe-Stämmen, wie zum Beispiel *Saccharomyces*

cerevisiae, *Candida albicans* und *Schizosaccharomyces pombe* (Macreadie *et al.*, 1996, 1997) auslöst. Eine erhöhte Konzentration von bivalenten Kationen, insbesondere Magnesium und Kalzium, verhindert die Aufnahme der Vpr-Peptide und dadurch deren toxische Effekte. Weiterführende Studien zeigten, daß ein C-terminales Vpr-Peptid (Positionen 71-82) die
5 Membranpermeabilisierung, weiterhin eine Reduktion des Mitochondrienmembranpotentials und letztendlich den Zelltod von CD4⁺ T-Zellen bewirkt (Macreadie *et al.*, 1997). Schließlich wurden ähnliche toxische Effekte ebenfalls für Gesamt-Vpr demonstriert (Arunagiri *et al.*, 1997). Dazu wurde das gleiche rekombinante Glutathione S-Transferase(GST)-Vpr-Fusionsprotein eingesetzt, welches zuvor für Ionenkanalstudien an Vpr verwendet wurde (Piller *et al.*, 1996). Jedoch
10 berichten die Autoren ebenfalls über Probleme mit der Löslichkeit des rekombinanten Produktes in wässrigen Systemen.

Rekombinantes Vpr des Isolates HIV-1_{NL4-3} wurde in Insektenzellen nach Infektion mit rekombinanten Baculoviren exprimiert (Levy *et al.*, 1995). Die Reinigung des Produktes erfolgte lediglich durch Immunaффinitätschromatographie an immobilisiertem polyklonalem Antiserum,
15 welches gegen die N-terminale Domäne von Vpr gerichtet ist. Dazu wurden Zellkulturüberstände eingesetzt, da rekombinantes Vpr unspezifisch in das Kulturmedium sekretiert wird. Reinigungsstrategien für die Produktion größerer Mengen an rekombinanten Vpr wurden nicht beschrieben. In den meisten Fällen wurden von Autoren Vpr-haltige Zellkulturüberstände für biologische Tests verwendet. Dabei konnte gezeigt werden, daß rekombinantes Vpr die
20 Virusreplikation in PBMC (peripheral blood mononuclear cells) und in verschiedenen latent infizierten Monozyten- und T-Zelllinien aktiviert. Wesentliche Nachteile dieses Verfahrens sind:

- geringe Ausbeute und keine Möglichkeit zur Herstellung von mg-Mengen an hochreinem Produkt;
- rekombinantes Vpr wurde im Prozeß der Affinitätsreinigung mit Detergentien versetzt,
25 wodurch Dialyse und Renaturierung notwendig wurden;
- Studien zu einer möglichen posttranslationalen Modifizierung von Vpr in Insektenzellen wurden nicht beschrieben;
- die Wirkung von rekombinanten Vpr in HIV-infizierten primären Monozyten / Makrophagen wurde nicht getestet.

30 Expression, Reinigung sowie biochemische Charakterisierung von rekombinanten Vpr wurden erstmals 1994 von Zhao und Mitarbeitern beschrieben. Dazu wurde die kodierende Sequenz des Vpr-Proteins des Isolates HIV-1_{89.6} in *E. coli* als Fusionsprotein exprimiert. Zum Zweck der Reinigung und des Nachweises wurde in diesem Verfahren C-terminal eine 25 Aminosäuren lange Sequenz des heterologen FLAG-Epitopes fusioniert. Außer der Oligomerisierung wurde

über keine biologischen Aktivitäten des rekombinanten Produktes in dieser Arbeit berichtet. Wesentlicher Nachteil dieses Verfahrens ist die Tatsache, daß Vpr nicht in seiner authentischen Sequenz, sondern als Fusionsprotein exprimiert wird.

In einem weiteren Verfahren wurde Vpr des Isolates HIV-1_{HXB2} in *E. coli* als GST-Fusionsprotein exprimiert (Piller *et al.*, 1996). Nach Affinitätschromatographie an Glutathione-Agarose wurde Vpr durch Thrombin-Spaltung vom Fusionsanteil befreit. Wesentlicher Nachteil dieses Verfahrens ist die Tatsache, daß Vpr nach Spaltung eine starke Tendenz zur Aggregation besitzt und nicht in wässriger Lösung gehalten werden kann. So berichten zum Beispiel Arunagiri und Mitarbeiter (1997), daß mit diesem Verfahren hergestelltes rekombinantes Vpr nach Abspaltung des GST-Fusionsanteils nicht in Lösung gehalten werden kann, sondern nur durch Beibehaltung des heterologen Fusionsanteils Vpr in wässrigen Systemen getestet werden konnte.

In der Patentanmeldung WO 95/26361 (Azad, A.A., Macreadie, I.G., Arunagiri, C., 1995) werden biologisch aktive Peptidfragmente des Vpr-Proteins von HIV beschrieben; pharmazeutische Verbindungen, welche diese Peptide oder biologisch aktive Analoga davon enthalten; Antagonisten der Vpr-Peptide sowie pharmazeutische Verbindungen, welche diese Vpr-Antagonisten enthalten. Die chemische Synthese von Gesamt-Vpr-Protein spielt darin keine Rolle.

In der WO 96/07741 (Cohen, E.; Bergeron, D.; Checroune, F.; Yao, X.-J.; Pignac-Kobinger, G., 1996) werden chimere Moleküle unter Schutz gestellt, bestehend aus Vpr von HIV-1 und Vpx von HIV-2, welche spezifisch in HIV-1/HIV-2-Viruspartikel eingebaut werden können und dort die strukturelle Organisation und funktionelle Integrität von Virionen stören. Sie sind jedoch für den Einsatz zur Gentherapie von HIV-1/HIV-2-Infektionen ausgeschlossen.

In WO 96/08970 (Weiner, D.B.; Levy, D.N.; Refaeli, Y., 1996) werden Methoden zur Inhibierung der Zellteilung und der Lymphozyten-Aktivierung unter Anwendung von Vpr-Proteinen, Fragmenten von Vpr oder Gensequenzen von Vpr beschrieben. Die chemische Synthese von Vpr-Proteinen spielt darin keine Rolle.

Die Verwendung von *vpr* Genen im screening assay für anti-HIV-Arzneimittel wird in den US-Patenten 5721104 und 5639619 beschrieben, zur Bestimmung von HIV-2 in US 5580739, ein Vpr-Rezeptor-Protein in US 5780238.

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, einen Syntheseweg für Vpr-Peptide im mg-Maßstab zu entwickeln, ihre Reinigung zu ermöglichen, und der Allgemeinheit das Endprodukt zur Verfügung zu stellen.

Die Aufgabe wurde erfindungsgemäß durch die Bereitstellung des Proteins sVpr1-96 sowie der Peptide

- ein 47 Aminosäuren langes N-terminales Peptid (sVpr1-47),
- 5 - ein 49 Aminosäuren langes C-terminales Peptid (sVpr48-96) und von Fragmenten dieser Peptide, zum Beispiel
- überlappende, etwa 15 Aminosäuren lange Peptide für die Epitop-Charakterisierung und isolelektrische Fokussierung
- etwa 20 Aminosäuren lange Peptide zur strukturellen und funktionellen Charakterisierung
- 10 einzelner Domänen von Vpr, insbesondere die Peptide sVpr1-20 und sVpr21-40 gelöst:

sVpr1-96:

H-Met-Glu-Gln-Ala-Pro-Glu-Asp-Gln-Gly-Pro-Gln-Arg-Glu-Pro-Tyr-Asn-Glu-Trp-Thr-Leu-Glu-Leu-Leu-Glu-Glu-Leu-Lys-Ser-Glu-Ala-Val-Arg-His-Phe-Pro-Arg-Ile-Trp-Leu-His-Asn-Leu-Gly-Gln-His-Ile-Tyr-Glu-Thr-Tyr-Gly-Asp-Thr-Trp-Ala-Gly-Val-Glu-Ala-Ile-Ile-Arg-Ile-
15 Leu-Gln-Gln-Leu-leu-Phe-Ile-His-Phe-Arg-Ile-Gly-Cys-Arg-His-Ser-Arg-Ile-Gly-Val-Thr-Arg-Gln-Arg-Arg-Ala-Arg-Asn-Gly-Ala-Ser-Arg-Ser-OH

sVpr1-47:

H-Met-Glu-Gln-Ala-Pro-Glu-Asp-Gln-Gly-Pro-Gln-Arg-Glu-Pro-Tyr-Asn-Glu-Trp-Thr-Leu-Glu-Leu-Leu-Glu-Glu-Leu-Lys-Ser-Glu-Ala-Val-Arg-His-Phe-Pro-Arg-Ile-Trp-Leu-His-Asn-
20 Leu-Gly-Gln-His-Ile-Tyr-NH₂

sVpr48-96:

Glu-Thr-Tyr-Gly-Asp-Thr-Trp-Ala-Gly-Val-Glu-Ala-Ile-Ile-Arg-Ile-Leu-Gln-Gln-Leu-leu-Phe-Ile-His-Phe-Arg-Ile-Gly-Cys-Arg-His-Ser-Arg-Ile-Gly-Val-Thr-Arg-Gln-Arg-Arg-Ala-Arg-Asn-Gly-Ala-Ser-Arg-Ser-OH

25 sVpr1-20 als sVpr1-20(Asn^{5,10,14}):

H-Met-Glu-Gln-Ala-Asn-Glu-Asp-Gln-Gly-Asn-Gln-Arg-Glu-Asn-Tyr-Asn-Glu-Trp-Thr-Leu-NH₂ und

sVpr21-40 als sVpr21-40(Asn³⁵):

H-Glu-Leu-Leu-Glu-Glu-Leu-Lys-Ser-Glu-Ala-Val-Arg-His-Phe-Asn-Arg-Ile-Trp-Leu-His-NH₂

30 ,

Fragmente dieser Peptide - mit etwa 15 Aminosäuren langen Peptiden

sVpr11-25:

Gln-Arg-Glu-Pro-Tyr-Asn-Glu-Trp-Thr-Leu-Glu-Leu-Leu-Glu-Glu-,

sVpr41-55:

Asn-Leu-Gly-Gln-His-Ile-Tyr-Glu-Thr-Tyr-Gly-Asp-Thr-Trp-Ala,
sVpr46-60:

Ile-Tyr-Glu-Thr-Tyr-Gly-Asp-Thr-Trp-Ala-Gly-Val-Glu-Ala-Ile-,
sVpr56-70:

5 Gly-Val-Glu-Ala-Ile-Ile-Arg-Ile-Leu-Gln-Gln-Leu-leu-Phe-Ile,
sVpr66-80:

Gln-Leu-leu-Phe-Ile-His-Phe-Arg-Ile-Gly-Cys-Arg-His-Ser-Arg,
sVpr76-96:

Cys-Arg-His-Ser-Arg-Ile-Gly-Val-Thr-Arg-Gln-Arg-Arg-Ala-Arg-Asn-Gly-Ala-Ser-Arg-Ser-
 10 OH,

Die Synthese der C-terminalen Vpr-Peptide erfolgte an einem Serin-Harz mit Hilfe eines Perkin-Elmer-Synthesizers. Alle N-terminalen Peptide wurden an einem Polystyren-Polyoxyethylen-Trägerharz synthetisiert. Der Aufbau der Peptide erfolgte mittels
 15 Fmoc(Fluormethyloxycarbonyl)-Strategie unter Verwendung von Schutzgruppen. Nach Beendigung der Synthese erfolgte die Abspaltung der Schutzgruppen mittels eines Abspaltungsgemisches, bestehend aus 95% Trifluoressigsäure, der 3% Triisopropylsilan und je nach Peptid 2 bis 5 % Ethandithiol zugesetzt wurde. Das Harz wurde abgetrennt, die Reaktionslösung eingeeengt und mit Heptan versetzt. Es wurde erneut eingeeengt und das
 20 verbleibende Öl mit Diethylether digeriert. Das rohe Peptid wurde abgesaugt und anschließend aus Essigsäure lyophilisiert. Zur Reinigung wurden die Rohpeptide an einer präparativen HPLC-Anlage (High Pressure Liquid Chromatography) chromatographiert. Alle Peptide wurden an einer Kieselgelsäule mittels eines linearen Gradienten, bestehend aus TFA (Trifluoressigsäure) in Wasser und TFA in Acetonitril gereinigt. Die Eluate wurden eingeeengt und lyophilisiert.

25 Überraschenderweise hat sich herausgestellt, daß die erfindungsgemäß hergestellten sVpr-Peptide nach dieser Reinigungsprozedur - im Unterschied zu den bislang beschriebenen rekombinanten oder synthetischen Produkten - wasserlöslich sind und selbst in hohen Konzentration von bis zu mM-Lösungen keiner Proteinaggregation unterliegen. Es konnte gezeigt werden, daß das Protein sVpr1-96 eine gefaltete Struktur annimmt, biologische
 30 Aktivitäten vergleichbar mit viralen Vpr hat und immunologisch reaktiv ist.

Erstmals wird die chemische Synthese des Vpr-Proteins und seiner Fragmente beschrieben, welcher der Aminosäuresequenz des Virusisolates HIV-1_{NL4-3} entspricht.

Unter dem Begriff synthetische (s) Vpr-Peptide werden im Rahmen der vorliegenden Erfindungsbeschreibung die durch Festphasensynthese hergestellten Peptide verstanden, welche

die authentische Aminosäuresequenz des nativen Vpr-Proteins enthalten, so wie dieses durch das *vpr* Gen des molekularen Isolates HIV-1_{NL4.3} kodiert wird.

Das Wesen der Erfindung liegt in einer Kombination bekannter Merkmale (Ausgangsstoffe, Synthescharze, Synthesizer) und neuer Lösungswege – der erstmaligen chemischen Synthese dieser Verbindungen, der Synthesestrategie, der Wahl der spezifischen Schutzgruppen, dem 5 erfindungsgemäßen Abspaltungsgemisch Trifluoressigsäure-Triisopropylsilan-Ethandithiol, dem Einsatz eines bestimmten Lösungsmittelgradienten (TFA-Wasser- : TFA-Acetonitril für die Reinigung - die sich gegenseitig beeinflussen und in ihrer neuen Gesamtwirkung einen Gebrauchsvorteil und den erstrebten Erfolg ergeben, der darin liegt, daß nunmehr neue 10 synthetisch hergestellte sVpr-Peptide zur Verfügung stehen.

Die erfindungsgemäß hergestellten synthetischen Peptide zeichnen sich durch folgende Eigenschaften aus:

Sie haben eine extrem gute Löslichkeit in wässrigen Systemen, welche bis zu mM konzentrierte Peptid-Lösungen erlauben. Dies wiederum ist Voraussetzung für nachfolgende Strukturanalysen 15 von Vpr mittels NMR(Nuclear Magnetic Resonance)-spektroskopischer und RKSA(Röntgenkristallstrukturanalyse)-Techniken.

Die Peptide lassen sich unter ökonomisch vertretbaren Bedingungen im mg-Maßstab herstellen und bis zu einem hohen Reinheitsgrad anreichern. Sie zeigen immunogene und biologische Eigenschaften, welche identisch sind mit denen von natürlichen Vpr-Proteinen. Sie lassen sich 20 für vielfältige Gebiete der Grundlagenforschung sowie der angewandten Forschung auf dem Gebiet der HIV-Virologie einsetzen.

Die erfindungsgemäßen Peptide finden Verwendung in biologischen Assays, in der Strukturanalyse von Vpr und dessen Domänen, zur Erzeugung von Antikörpern gegen HIV-Peptidsequenzen, in antiviralen Reagenzien, zum Aufbau von Testsystemen zum Screenen von 25 potentiellen Vpr-Antagonisten, bei der Etablierung von Zellkultur- und Tiermodellen, zur Untersuchung der Pathomechanismen von Vpr, für die *in vitro* Assemblierung von neuartigen Vektoren für den Einsatz bei Gentransfermethoden in der Gentherapie und zur Entwicklung von serologischen Testmethoden, insbesondere eines Vpr-Antigen-ELISA.

Die erfindungsgemäß hergestellten Produkte können für die Aufklärung der molekularen Struktur 30 von Vpr mittels NMR- und CD-spektroskopischen Methoden sowie der Kristallisation und nachfolgender RKSA eingesetzt werden. Diese Informationen wiederum sind essentiell für das Verständnis der molekularen Wirkungsweise des Vpr-Proteins im HIV-1-Replikationszyklus und der damit verbundenen Pathomechanismen einer AIDS-Erkrankung sowie dem molekularen Design von potentiellen Vpr-Antagonisten.

Weiterhin können mit diesen Produkten *in vitro* Testsysteme dargestellt werden, welche das intensive Screening von potentiellen anti-Vpr-wirksamen Reagenzien erlauben. Darüber hinaus können sie für die Erzeugung und Testung von Vpr-spezifischen Antikörpern und für serologische Testverfahren angewendet werden.

- 5 Die Erfindung wird in der Peptidchemie, der virologischen Grundlagenforschung, der Strukturanalyse sowie der medizinischen Diagnostik angewendet.

Die Erfindung kann zur Herstellung von poly- und monoklonalen Vpr-spezifischen Antikörpern oder Antisera, speziell zur Gewinnung von Epitop-differenten Vpr-spezifischen Antikörpern verwendet werden. Weitere Anwendungsgebiete sind: serologische Testverfahren, als Vpr-Antigen(Ag)-ELISA, als Standard-Antigen für die Eichung von Vpr-Ag-ELISA-Techniken, Nachweis zur Konzentrationsbestimmung von viralem Vpr im Blut HIV-infizierter Individuen, Testsysteme zur Bestimmung von Vpr-Antagonisten, Komplementierung der Funktion von endogenen, viralen Vpr in Zellkulturen, die mit vpr-defizienten HIV-Mutanten infiziert sind, Komplementierung der Funktion von viralem Vpr in Kulturen von primären humanen Lymphozyten, die mit vpr-defizienten HIV-Mutanten infiziert sind und Komplementierung der Funktion von viralen Vpr in Kulturen von ausdifferenzierten primären humanen Monozyten / Makrophagen, die mit vpr-defizienten HIV-Mutanten infiziert sind.

Die Erfindung eignet sich außerdem zur Bestimmung von Reagenzien, die

- a) die Wechselwirkung von Vpr mit zellulären Faktoren, wie zum Beispiel mit dem Glucocorticoid-Rezeptor, Transkriptionsfaktoren und anderen DNA-interagierenden Enzymen und Faktoren unterbinden;
- b) die Transkriptions-aktivierende Wirkung von Vpr verhindern;
- die Aktivität von Vpr auf die Wirkung von Steroidhormone regulieren, beeinflussen oder verhindern;
- 25 c) den Transport von Vpr allein oder im Verbund mit anderen Komponenten des HIV-Präintegrationskomplexes regulieren, beeinflussen oder verhindern;
- den Einbau von Vpr in Viruspartikel während der HIV-Assemblierung regulieren, beeinflussen oder verhindern;
- d) den Vpr-induzierten Zellzyklusarrest regulieren, beeinflussen oder verhindern
- 30 den Effekt von Vpr auf Zelldifferenzierung und Zellwachstum regulieren, beeinflussen oder verhindern
- e) die zytotoxischen Effekte von Vpr regulieren, beeinflussen oder verhindern und
- f) die Ionenkanalaktivität von Vpr regulieren, beeinflussen oder verhindern

Weiterhin ist die Verwendung für *in vivo* Testsysteme zur Bestimmung von Vpr-Antagonisten

möglich. Die Erfindung eignet sich auch für Tiermodellstudien. Ein weiterer Vorteil besteht darin, daß konzentrierter Peptid-Lösungen bereitgestellt werden können. So können spezifische Vpr-Antagonisten hergestellt werden. Ein weiteres Anwendungsgebiet ist die Reduktion der durch die N-terminale Domäne von Vpr induzierten Flexibilität von sVpr-Protein mittels

5 strukturstabilisierenden Faktoren. Bei diesen Faktoren handelt es sich um die UBA2-Domäne des DNA-Reparaturproteins HHR23A, welches an Vpr bindet, Fab-Fragmente von Vpr-spezifischen Immunglobulinen oder virale Faktoren, insbesondere Komponenten des HIV-1 Gag-Polyproteinprecursurs Pr55Gag, welche im Prozess der Virus-Assemblierung mit Vpr in Verbindung treten, dem humanen Glucocorticoidrezeptor oder Bestandteile davon. Mit der

10 Erfindung lassen sich eine in vitro Assemblierung von retroviralen Präintegrationskomplexen, in vitro oder in vivo applizierbaren Gentransfermethoden, Transfektionen, Integration in chromosomale und episomale Wirts-DNA oder andere Gentransfermethoden in eukaryotischen Zellen oder Gentransfers von in vitro hergestellter und/oder manipulierter Genfragmente in Zellen, Gewebe oder Organismen mit dem Zweck einer gentherapeutischen Applikation

15 erreichen.

Sie soll anhand von Ausführungsbeispielen näher erläutert werden, ohne auf sie beschränkt zu sein.

20

Ausführungsbeispiele

Beispiel 1:

Synthese von Vpr-Peptiden - Allgemeine Vorschrift

25

Die Synthese der C-terminalen Vpr-Peptide erfolgte an einem Serin-Harz der Fa. Rapp Polymere Tübingen an einem ABI 433A Synthesizer (Perkin Elmer).

Alle N-terminalen Peptide wurden an einem Polystyren-polyoxyethylen-Trägerharz (TentaGel R-RAM-Harz der Fa. Rapp Polymere) synthetisiert.

30 Der Aufbau der Peptide erfolgte mittels FMOC(Fluormethyloxycarbonyl)-Strategie unter Verwendung nachfolgender Schutzgruppen: O-t-Butylester für Glu und Asp, OtBu-Ether für Serin, Tyrosin und Threonin. Boc (tert-Butoxycarbonyl-) für Lysin und Tryptophan. Trt (Trityl - Triphenylmethyl-) für Histidin, Glutamin und Asparagin sowie Pbf (2.2.4.6.7-pentamethyl-dihydrobenzofuran-5-sulfonyl-) für Arginin.

Nach Beendigung der Synthese erfolgte die Abspaltung der Schutzgruppen mittels eines Abspaltungsgemisches, bestehend aus 95% Trifluoressigsäure, der 3% Triisopropylsilan und je nach Peptid 2 bis 5 % Ethandithiol zugesetzt wurde. Das Harz wurde abgetrennt, die Reaktionslösung eingeeengt und mit Heptan versetzt. Es wurde erneut eingeeengt und das
 5 verbleibende Öl mit Diethylether digeriert. Das rohe Peptid wurde abgesaugt und anschließend aus 10%iger Essigsäure lyophilisiert.

Beispiel 2:

Reinigung der Peptide - Allgemeine Vorschrift

- 10 Zur Reinigung wurden jeweils 100 mg Rohpeptid an einer präparativen HPLC-Anlage (Shimadzu LC-8 Anlage) chromatographiert. Alle Peptide wurden an einer Kieselgelsäule (300 x 400 mm Vydac-RP18-Säule, Korngröße 15 - 20 µM) mittels eines linearen Gradienten, bestehend aus A = 1% TFA (Trifluoressigsäure) in Wasser und B = 0,1% TFA in 80%igem Acetonitril mit einem Fluss von 100 ml / min gereinigt. Die Eluate wurden eingeeengt und
 15 lyophilisiert.

Beispiel 3:

sVpr1-96

- Das Peptid wurde an einem TentaGel S-AC-Harz (0,20 mmol/Gramm) an einem ABI 433
 20 aufgebaut. Am Schluß der Synthese wurde die Fmoc-Schutzgruppe abgespalten, das Harz nacheinander mit Dimethylformamid und Methylenchlorid gewaschen und getrocknet. Das Peptid wurde dann in der eingangs beschriebenen Weise vom Harz abgespalten und anschließend gereinigt.

Molmasse: 11378 gef. 11381

- 25 H-Met-Glu-Gln-Ala-Pro-Glu-Asp-Gln-Gly-Pro-Gln-Arg-Glu-Pro-Tyr-Asn-Glu-Trp-Thr-Leu-Glu-Leu-Leu-Glu-Glu-Leu-Lys-Ser-Glu-Ala-Val-Arg-His-Phe-Pro-Arg-Ile-Trp-Leu-His-Asn-Leu-Gly-Gln-His-Ile-Tyr-Glu-Thr-Tyr-Gly-Asp-Thr-Trp-Ala-Gly-Val-Glu-Ala-Ile-Ile-Arg-Ile-Leu-Gln-Gln-Leu-leu-Phe-Ile-His-Phe-Arg-Ile-Gly-Cys-Arg-His-Ser-Arg-Ile-Gly-Val-Thr-Arg-Gln-Arg-Arg-Ala-Arg-Asn-Gly-Ala-
 30 Ser-Arg-Ser-OH

Figur 1: sVpr1-96 - Direkte Auftrennung im SDS-PAGE (A)

Immunpräzipitation vor SDS-PAGE (B)

Figur 2: sVpr1-96 - Präparative Reinigung des Rohpeptids - HPLC-Chromatogramm

Figur 3: sVpr1-96 - Massenspektrum (% Int. und Molmasse)

Beispiel 4:

sVpr1-47

5 Analog zu Beispielen 1 bis 3.

Molmasse: 5728 gef. 5728.8

H-Met-Glu-Gln-Ala-Pro-Glu-Asp-Gln-Gly-Pro-Gln-Arg-Glu-Pro-Tyr-Asn-Glu-Trp-Thr-Leu-
Glu-Leu-Leu-Glu-Glu-Leu-Lys-Ser-Glu-Ala-Val-Arg-His-Phe-Pro-Arg-Ile-Trp-Leu-His-Asn-
Leu-Gly-Gln-His-

10 Ile-Tyr-NH₂

Figur 4: sVpr1-47 - Massenspektrum (% Int. und Molmasse)

Beispiel 5:

sVpr48-96

15 Analog zu Beispielen 1 bis 3.

Glu-Thr-Tyr-Gly-Asp-Thr-Trp-Ala-Gly-Val-Glu-Ala-Ile-Ile-Arg-Ile-Leu-Gln-Gln-Leu-leu-Phe-
Ile-His-Phe-Arg-Ile-Gly-Cys-Arg-His-Ser-Arg-Ile-Gly-Val-Thr-Arg-Gln-Arg-Arg-Ala-Arg-Asn-
Gly-Ala-Ser-Arg-Ser-OH

20 Beispiel 6:

sVpr1-20

Analog zu Beispielen 1 bis 3.

H-Met-Glu-Gln-Ala-Pro-Glu-Asp-Gln-Gly-Pro-Gln-Arg-Glu-Pro-Tyr-Asn-Glu-Trp-Thr-Leu-
NH₂

25 Figur 5: sVpr1-20 - Massenspektrum (%Int. 10% =111 mV[sum= 9505 mV] Profiles
1-85 Unsmoothed und Molmasse)

Beispiel 7:

sVpr1-20(Asn^{5,10,14})

30 Analog zu Beispielen 1 bis 3.

H-Met-Glu-Gln-Ala-Pro-Glu-Asp-Gln-Gly-Pro-Gln-Arg-Glu-Pro-Tyr-Asn-Glu-Trp-Thr-Leu-

NH₂

Beispiel 8:

sVpr21-40

5 Analog zu Beispielen 1 bis 3.

Wildtyp-Sequenz

H-Glu-Leu-Leu-Glu-Glu-Leu-Lys-Ser-Glu-Ala-Val-Arg-His-Phe-Asn-Arg-Ile-Trp-Leu-His-NH₂

Figur 6: sVpr21-40 - Massenspektrum (%Int. 10% = 335 mV[sum= 28541 mV] Profiles
1-85 Unsmoothed und Molmasse)

10

Beispiel 9:

sVpr21-40(Asn³⁵)

Analog zu Beispielen 1 bis 3.

H-Glu-Leu-Leu-Glu-Glu-Leu-Lys-Ser-Glu-Ala-Val-Arg-His-Phe-Asn-Arg-Ile-Trp-Leu-His-NH₂

15

Beispiel 10:

sVpr11-25:

Analog zu Beispielen 1 bis 3.

Gln-Arg-Glu-Pro-Tyr-Asn-Glu-Trp-Thr-Leu-Glu-Leu-Leu-Glu-Glu-

20

Beispiel 11:

sVpr41-55:

Analog zu Beispielen 1 bis 3.

Asn-Leu-Gly-Gln-His-Ile-Tyr-Glu-Thr-Tyr-Gly-Asp-Thr-Trp-Ala

25

Beispiel 12:

sVpr46-60:

Analog zu Beispielen 1 bis 3.

Ile-Tyr-Glu-Thr-Tyr-Gly-Asp-Thr-Trp-Ala-Gly-Val-Glu-Ala-Ile-

30

Beispiel 13:

sVpr56-70:

Analog zu Beispielen 1 bis 3.

Gly-Val-Glu-Ala-Ile-Ile-Arg-Ile-Leu-Gln-Gln-Leu-leu-Phe-Ile

5

Beispiel 14:

sVpr66-80:

Analog zu Beispielen 1 bis 3.

Gln-Leu-Leu-Phe-Ile-His-Phe-Arg-Ile-Gly-Cys-Arg-His-Ser-Arg

10

Beispiel 15:

sVpr76-96

Analog zu Beispielen 1 bis 3.

Cys-Arg-His-Ser-Arg-Ile-Gly-Val-Thr-Arg-Gln-Arg-Arg-Ala-Arg-Asn-Gly-Ala-Ser-Arg-Ser-OH

15

Literaturverzeichnis:

- Adachi, A.; Gendelman, H. E.; König, S.; Folks, T.; Willey, R. L.; Rabson, A.; Martin, M.A. (1986) Production of acquired immunodeficiency syndrome-associated retrovirus in human and non-human cells transfected with an infectious molecular clone. *J. Virol.* 59:284-291.
- Arunagiri, C.; Macreadie, I.; Hewish, D.; Azad, A. (1997) A C-terminal domain of HIV-1 accessory protein Vpr is involved in penetration, mitochondrial dysfunction and apoptosis of human CD4⁺ lymphocytes. *Apoptosis* 2:69-76.
- Collman, J.W.; Balliet, J.W.; Greory, S.A.; Friedman, H.; Kolson, D.L.; Nathanson, N.; Srinivasan, A. (1992) An infectious molecular clone of an unusual macrophage-tropic and highly cytopathic strain of human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* 66:5717-5721.
- Di Marzio, P.; Choe, S.; Ebright, M.; Knoblauch, R.; Landau, N.R. (1995) Mutational analysis of cell cycle arrest, nuclear localization and virion packaging of human immunodeficiency virus type 1 Vpr. *J. Virol.* 69:7909-7916.
- Kondo, E.; Göttinger, H.G. (1996) A conserved LXXLF sequence is the major determinant in p6^{gag} required for the incorporation of human immunodeficiency virus type 1 Vpr. *J. Virol.* 70:159-164.

- Kondo, E.; Mammano, F.; Cohen, E.A.; Göttinger, H.G. (1995) The p6^{gag} domain of human immunodeficiency virus type 1 is sufficient for incorporation of Vpr into heterologous viral particles. *J.Virol.* 69:2759-2764.
- Lavallée, C.; Yao, X.J.; Ladha, A.; Göttinger, H.G.; Haseltine, W.A.; Cohen, E.A. (1994)
5 Requirement of the Pr55^{gag} precursor for incorporation of the Vpr product into human immunodeficiency virus type 1 viral particles. *J. Virol.* 68:1926-1934.
- Levy, D.N.; Refaeli, Y.; Weiner, D.B. (1995) Extracellular Vpr protein increases cellular permissiveness to human immunodeficiency virus type 1. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 91:10873-10877.
- 10 Lu, Y.-L.; Bennett, R.P.; Wills, J.W.; Gorelick, R.; Ratner, L. (1995) A leucine triplet repeat sequence (LXX)₄ in p6^{gag} is important for Vpr incorporation into human immunodeficiency virus type 1 particles. *J. Virol.* 69:6873-6879.
- Luo, Z.; Butcher, D.J.; Murali, R.; Srinivasan, A.; Huang, Z. (1998) Structural studies of synthetic peptide fragments derived from the HIV-1 Vpr protein. *Biochem. Biophys. Research*
15 *Communications* 244:732-736.
- Macreadie, I.G.; Arunagiri, C.K.; Hewish, D.R.; White, J.F.; Azad, A.A. (1996) Extracellular addition of a domain of HIV-1 Vpr containing the amino acid sequence motif H(S/F)RIG causes cell membrane permeabilization and death. *Mol.Microbiol.* 19:1185-1192.
- Macreadie, I.G.; Kirkpatrick, A.; Strike, P.M.; Azad, A.A. (1997) Cytocidal activities of HIV-1
20 Vpr and SAC1P peptides bioassayed in yeast. *Protein and Peptide Letters* 4:181-186.
- Mahalingam, S.; Ayyavoo, V.; Patel, M.; Kieber-Emmons, T.; Weiner, D.B. (1997) Nuclear import, virion incorporation, and cell cycle arrest/differentiation are mediated by distinct functional domains of human immunodeficiency virus type 1 Vpr. *J.Virol.* 71:6339-6347.
- Mahalingam, S.; Collman, R.G.; Patel, M.; Monken, C.E.; Srinivasan, A. (1995a) Functional
25 analysis of HIV-1 Vpr: Identification of determinants essential for subcellular localization. *Virol.* 212:331-339.
- Mahalingam, S.; Khan, S.H.; Jabbar, M.A.; Monken, C.E.; Collman, R.G.; Srinivasan, A. (1995b) Identification of residues in the N-terminal acidic domain of HIV-1 Vpr essential for virion incorporation. *Virol.* 207:297-302.
- 30 Mahalingam, S.; Khan, S.H.; Murali, R.; Jabbar, M.A.; Monken, C.E.; Collman, R.G.; Srinivasan, A. (1995c) Mutagenesis of the putative alpha-helical domain of the Vpr protein of human immunodeficiency virus type 1: effect on stability and virion incorporation. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 92:3794-3798.
- Mahalingam, S.; Patel, M.; Collman, R.G.; Srinivasan, A. (1995d) The carboxy-terminal domain

- is essential for stability and not for virion incorporation of HIV-1 Vpr into virus particles. *Virol.* 214:647-652.
- Nie, Z.; Bergeron, D.; Subbramanian, R.A.; Yao, X.-J.; Checroune, F.; Rougeau, N.; Cohen, E.A. (1998) The putative alpha helix 2 of human immunodeficiency virus type 1 Vpr contains a
5 determinant which is responsible for the nuclear translocalization of proviral DNA in growth-arrested cells. *J. Virol.* 73:4104-4115.
- Paxton, W.; Connor, R.I.; Landau, N.R. (1993) Incorporation of vpr into human immunodeficiency virus type 1 virions: requirement for the p6 region of gag and mutational analysis. *J. Virol.* 67:7229-7237.
- 10 Piller, S.C.; Ewart, G.D.; Premkumar, A.; Cox, G.B.; Gage, P.W. (1996) Vpr protein of human immunodeficiency virus type 1 forms cation-selective channels in planar lipid bilayers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:111-115.
- Roques, B.P.; Morellet, N.; de Rocquigny, H.; Déméné, H.; Schueler, W.; Jullian, N. (1997) Structure, biological functions and inhibition of the HIV-1 proteins Vpr and NCp7. *Biochimie*
15 79:673-680.
- de Rocquigny, H.; Petitjean, P.; Tanchou, V.; Decimo, D.; Drouot, L.; Delaunay, T.; Darlix, J.-L.; Roques, B.P. (1997) The zinc fingers of HIV nucleocapsid protein NCp7 direct interactions with the viral regulatory protein Vpr. *J. Biol. Chem.* 272(49): 30753-30759.
- Wang, B.; Ge, Y.C.; Palasanthiran, P.; Xiang, S.-H.; Ziegler, J.; Dwyer, D.E.; Randle, C.;
20 Dowton, D.; Cunningham, A.; Saksena, N.K. (1996) Gene defects clustered at the C-terminus of the *vpr* gene of HIV-1 in long-term nonprogressing mother and child pair: *in vivo* evolution of *vpr* quasispecies in blood and plasma. *Virol.* 223:224-232.
- Wang, L.; Mukherjee, S.; Narayan, O.; Zhao, L.-J. (1996) Characterization of a leucine-zipper-like domain in Vpr protein of human immunodeficiency virus type 1. *Gene* 178:7-13.
- 25 Yao, S.; Azad, A.A.; Macreadie, I.G.; Norton, R.S. (1998) Helical structure of polypeptides from the C-terminal half of HIV-1 Vpr. *Protein and Peptide Letters* 5:127-134.
- Yao, X.-J.; Subbramanian, R.A.; Rougeau, N.; Boisvert, F.; Bergeron, D.; Cohen, E.A. (1995) Mutagenic analysis of human immunodeficiency virus type 1 Vpr: role of a predicted N-terminal alpha-helical structure in Vpr nuclear localization and virion incorporation. *J. Virol.* 69:7032-
30 7044.
- Zhao, L.J.; Mukherjee, S.; Narayan, O. (1994a) Biochemical mechanism of HIV-1 Vpr function: specific interaction with a cellular protein. *J. Biol. Chem.* 269:15577-15582.
- Zhao, L.J.; Wang, L.; Mukherjee, S.; Narayan, O. (1994b) Biochemical mechanism of HIV-1 Vpr function: oligomerization by the N-terminal domain. *J. Biol. Chem.* 269:32131-32137.

Zhao, Y.; Cao, J.; O'Gorman, M.R.; Yu, M.; Yogev, R. (1996) Effect of human immunodeficiency virus type 1 protein R (vpr) gene expression on basic cellular function of fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. J. Virol. 70:5821-5826.

5 Legende zu den Figuren

Figur 1: Struktur- und Funktionsdomänen in Vpr

Folgende Primär- und Sekundär-Strukturelemente in Vpr sind der Aminosäuresequenz des Proteins Vpr von HIV-1NL4-3 zugeordnet: negativ geladener N-Terminus (Markierung (1),
10 Positionen 1-17); Helix alpha-1 (Markierung (2), Positionen 18-37); eine nicht näher definierte Region (Markierung (3), Positionen 38-51); Helix alpha-2 (Markierung (4), Positionen 51-76); basischer C-Terminus (Markierung (8), Positionen 77-96). Überlappend dazu sind weitere Bereiche angezeigt: eine Leuzin- und Isoleuzin-reiche Region, welche auch als Leuzin-Zipper-ähnlich oder auch "LR-Domäne" bezeichnet wird (Markierung (5), Positionen 60-80); eine
15 Region, welche das sich wiederholende Motiv "HF/SRIG" enthält (Markierung (6), Positionen 71-82); den vermutlichen Transmembrananker von Vpr, welcher notwendig für die Ionenkanalaktivität von Vpr ist (Markierung (7), Positionen 52-79).

Figur 2: Immunologische Reaktivität von polyklonalen Antikörpern spezifisch für sVpr1-96 im
20 Westernblot und Immunpräzipitation

Serum von Kaninchen immunisiert mit sVpr1-96, R-96, wurde in Westernblot (A) und Immunpräzipitation (B) getestet. Eine Verdünnungsreihe von 0.01 bis 10 ng sVpr1-96 wurde im SDS-PAGE (12.5% Acryl aide Gel) aufgetrennt (A). Eine ähnliche Verdünnungsreihe an sVpr1-96 wurde mit humanen Serum versetzt, und aus diesem Gemisch wurde mittels dem Serum R-96
25 das Peptid sVpr1-96 durch Immunpräzipitation isoliert, und nachfolgend ebenfalls im SDS-PAGE aufgetrennt (B). Nach Elektrotransfer auf PVDF-Membranen wurde sVpr1-96 mittels R-96 Antikörpern sowie anschließender Bindung von ¹²⁵I-Protein G detektiert. Das Autoradiogramm einer 2-Tage-Exposition ist in (A) und (B) dargestellt. Die Positionen von Molekulargewichtsstandardproteinen sind auf der linken Seite, sowie die Positionen von
30 unspezifischen Reaktion mit der schweren (hc) und leichten Kette (lc) der zur Immunpräzipitation eingesetzten Immunglobuline ist auf der rechten Seite angezeigt.

Figur 3: sVpr1-96 aktiviert Virusreplikation und erhöht Zahl lebender Zellen in Kulturen von humanen PBMC

Kulturen von PHA- und IL-2-aktivierte PBMCs wurden mit gleichen infektiösen Dosen folgender Virusstocks infiziert: HIV-1NL4-3 (A,B,C), NL4-3(AD8) (D) sowie der vpu-defizienten Mutante NL(AD8)-UDEL1 (E) und der vpr-defizienten Mutante NL(AD8)deltaR (F).

Während des Infektionsexperimentes wurden die Kulturen in Gegenwart von 10 nM sVpr1-96
5 oder 10 nM des Kontrollpeptides Vpu32-81 kultiviert. Die Virusfreisetzung ist als Profil der Virus-assoziierten RT-Aktivität im Zellkulturüberstand dargestellt (A,C,D,E,F). (B) zeigt die Zahl der lebenden Zellen im Experiment von (A).

Figur 4: sVpr1-96 aktiviert die Replikationskompetenz von vpr-defizienten HIV-1 Mutanten in
10 Kulturen von primären humanen Monozyten/Makrophagen isoliert von verschiedenen Donoren. Parallele Kulturen von ausdifferenzierten MDM-Isolaten gewonnen, von drei verschiedenen Donoren, wurden mit gleichen infektiösen Dosen von gereinigten Virusstocks des Makrophagen-tropen Virus NL4-3(AD8) sowie dessen vpr-defizienten Mutante NL(AD8)deltaR infiziert. Die Virusproduktion wurde über einen Zeitraum von etwa zwei Monaten verfolgt und als Virus-
15 assoziierte RT-Aktivität gegen die Zeit aufgetragen.

Figur 5: 2D 1H TOCSY Spektrum

(Mischungszeit = 110 ms) einer 2 mM-Lösung of sVpr1-96 in 1:1 (V/V) TFE-d2/H2O bei 300°K.

20 Die Ordinate und Abzisse zeigen die entsprechenden 1D 1H Spektren. Vergrößerungen der Regionen A, B und C werden in Figur 6 gezeigt.

Figur 6:

Vergrößerte Regionen der 2D TOCSY Spektren, dargestellt in Figur 5, welche den
25 Wechselwirkungen zwischen den Protonen H-7 und H-2 von Tryptophanresten (A); H-2 und H-4 von Histidinresten (B), und epsilon-H und alpha-H von Argininresten (C) entsprechen.

Figur 7: sVpr1-96 - Chromatogramm und Massenspektrum

30 Figur 8: sVpr1-47 - Massenspektrum

Figur 9: sVpr1-20 - Massenspektrum

Figur 10: sVpr21-40 - Massenspektrum

Patentansprüche

1. Synthetische Peptide des regulatorischen Virusproteins R (Vpr) des Humanen Immundefizienzvirus Typ 1 (HIV-1).
- 5 2. Peptide nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß es sich um
 - 2.1. ein 96 Aminosäuren langes Vpr-Protein (sVpr1-96)
 - 2.2. ein 47 Aminosäuren langes N-terminales Peptid (sVpr1-47)
 - 2.3. ein 49 Aminosäuren langes C-terminales Peptid (sVpr48-96) sowie
 - 10 2.4. Fragmente dieser Peptide, zum Beispiel
 - 2.4.1. überlappende, etwa 15 Aminosäuren lange Peptide für die Epitop-Charakterisierung und isoelektrische Fokussierung
 - 2.4.2. etwa 20 Aminosäuren lange Peptide zur strukturellen und funktionellen Charakterisierung einzelner Domänen von Vpr, insbesondere
 - 15 2.4.2.1. die Peptide sVpr1-20 und
 - 2.4.2.2. sVpr21-40
 handelt.
3. Peptide nach Ansprüchen 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß es sich
 - 20 3.1. bei dem 96 Aminosäuren langen Vpr-Protein um
 sVpr1-96
 H-Met-Glu-Gln-Ala-Pro-Glu-Asp-Gln-Gly-Pro-Gln-Arg-Glu-Pro-Tyr-Asn-Glu-Trp-Thr-Leu-
 Glu-Leu-Leu-Glu-Glu-Leu-Lys-Ser-Glu-Ala-Val-Arg-His-Phe-Pro-Arg-Ile-Trp-Leu-His-
 25 Asn-Leu-Gly-Gln-His-Ile-Tyr-Glu-Thr-Tyr-Gly-Asp-Thr-Trp-Ala-Gly-Val-Glu-Ala-Ile-
 Ile-Arg-Ile-Leu-Gln-Gln-Leu-leu-Phe-Ile-His-Phe-Arg-Ile-Gly-Cys-Arg-His-Ser-Arg-
 Ile-Gly-Val-Thr-Arg-Gln-Arg-Arg-Ala-Arg-Asn-Gly-Ala-Ser-Arg-Ser-OH
 - 3.2. bei dem 47 Aminosäuren langen N-terminalen Peptid um
 30 sVpr1-47
 H-Met-Glu-Gln-Ala-Pro-Glu-Asp-Gln-Gly-Pro-Gln-Arg-Glu-Pro-Tyr-Asn-Glu-Trp-Thr-Leu-
 Glu-Leu-Leu-Glu-Glu-Leu-Lys-Ser-Glu-Ala-Val-Arg-His-Phe-Pro-Arg-Ile-Trp-Leu-His-
 Asn-Leu-Gly-Gln-His-Ile-Tyr-NH₂

3.3. bei dem 49 Aminosäuren langen C-terminalen Peptid um
sVpr48-96

Glu-Thr-Tyr-Gly-Asp-Thr-Trp-Ala-Gly-Val-Glu-Ala-Ile-Ile-Arg-Ile-Leu-Gln-Gln-Leu-
leu-Phe-Ile-His-Phe-Arg-Ile-Gly-Cys-Arg-His-Ser-Arg-Ile-Gly-Val-Thr-Arg-Gln-Arg-Arg-Ala-
5 Arg-Asn-Gly-Ala-Ser-Arg-Ser-OH

3.4. bei den Fragmenten dieser Peptide um die etwa 15 Aminosäuren lange Peptide

3.4.1. sVpr11-25

Gln-Arg-Glu-Pro-Tyr-Asn-Glu-Trp-Thr-Leu-Glu-Leu-Leu-Glu-Glu-

10 3.4.2. sVpr41-55

Asn-Leu-Gly-Gln-His-Ile-Tyr-Glu-Thr-Tyr-Gly-Asp-Thr-Trp-Ala

3.4.3. sVpr46-60

Ile-Tyr-Glu-Thr-Tyr-Gly-Asp-Thr-Trp-Ala-Gly-Val-Glu-Ala-Ile-

3.4.4. sVpr56-70

15 Gly-Val-Glu-Ala-Ile-Ile-Arg-Ile-Leu-Gln-Gln-Leu-leu-Phe-Ile

3.5. bei den etwa 20 Aminosäuren langen Peptiden um

3.5.1. die Peptide sVpr1-20 als

sVpr1-20(Asn^{5,10,14})

20 H-Met-Glu-Gln-Ala-Asn-Glu-Asp-Gln-Gly-Asn-Gln-Arg-Glu-Asn-Tyr-Asn-Glu-Trp-Thr-Leu-
NH₂
und

3.5.2. sVpr21-40 als

sVpr 21-40(Asn³⁵)

25 H-Glu-Leu-Leu-Glu-Glu-Leu-Lys-Ser-Glu-Ala-Val-Arg-His-Phe-Asn-Arg-Ile-Trp-Leu-His-NH₂
handelt.

4. Verfahren zur Herstellung von neuen synthetischen Peptiden des regulatorischen Virusproteins
R (Vpr) des Humanen Immundefizienzvirus Typ 1 (HIV-1) nach den Ansprüchen 1 bis 3,
30 dadurch gekennzeichnet, daß die Synthese der C-terminalen Vpr-Peptide an einem Serin-Harz
mit Hilfe eines Perkin-Elmer-Synthesizers erfolgt, alle N-terminalen Peptide an einem
Polystyren-Polyoxyethylen-Trägerharz synthetisiert werden und der Aufbau der Peptide mittels
FMOC-Strategie unter Verwendung von Schutzgruppen erfolgt.

5. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß nach Beendigung der Synthese die Abspaltung der Schutzgruppen mittels eines Abspaltungsgemisches, bestehend aus 95% Trifluoressigsäure, der 3% Triisopropylsilan und je nach Peptid 2 bis 5 % Ethandithiol zugesetzt wurde, erfolgt und das Harz abgetrennt wird.

5

6. Verfahren nach den Ansprüchen 4 und 5, dadurch gekennzeichnet, daß die Rohpeptide an einer präparativen HPLC-Anlage chromatographiert und die Peptide an einer Kieselgelsäule mittels eines linearen Gradienten, bestehend aus TFA (Trifluoressigsäure) in Wasser und TFA in Acetonitril, gereinigt werden.

10

7. Verwendung von synthetischen (s) Peptiden des regulatorischen Virusproteins R (Vpr) Humaner Immundefizienzviren (HIV) zu therapeutischen und/oder diagnostischen Zwecken.

8. Verwendung nach Anspruch 7

15 8.1. in biologischen Assays

8.1.1. zur Entwicklung von serologischen Testmethoden

8.1.2. zur Entwicklung eines Vpr-Antigen-ELISA

8.2. zur Erzeugung von Antikörpern gegen HIV-Peptidsequenzen

8.3. in antiviralen Reagenzien

20 8.4. zum Aufbau von Testsystemen zum Screenen von potentiellen Vpr-Antagonisten

8.5. bei der Etablierung von Zellkultur- und Tiermodellen zur Untersuchung der Pathomechanismen von Vpr

8.6. in der Strukturanalyse von Vpr und dessen Domänen oder

8.7. bei der *in vitro* Assemblierung von neuartigen Vektoren für den Einsatz bei

25 Gentransfermethoden in der Gentherapie.

9. Verwendung nach Anspruch 7 und 8, dadurch gekennzeichnet, daß es sich um sVpr-Proteine handelt, in denen die N-terminale Domäne der sVpr-Proteine in einem, mehreren oder allen vier Prolin-Reste mutiert ist.

30

10. Verwendung nach Anspruch 7 bis 9 zur Herstellung von poly- und monoklonalen Vpr-spezifischen Antikörpern oder Antiseren.

11. Verwendung nach Anspruch 7 bis 10 zur Gewinnung von Epitop-differenten Vpr-

spezifischen Antikörpern.

12. Verwendung von Antikörpern nach Anspruch 7 bis 11 in serologischen Testverfahren.

5 13. Verwendung nach Anspruch 7 bis 12 in einem Vpr-Antigen(Ag)-ELISA.

14. Verwendung von sVpr-Proteinen nach Anspruch 7 bis 13 als Standard-Antigen für die Eichung von Vpr-Ag-ELISA-Techniken.

10 15. Verwendung nach Anspruch 7 und 8 zum Nachweis und zur Konzentrationsbestimmung von viralem Vpr im Blut HIV-infizierter Individuen.

16. Verwendung von sVpr-Proteinen nach Anspruch 7 und 8 für in vitro Testsysteme zur Bestimmung von Vpr-Antagonisten.

15

17. Verwendung nach Anspruch 7, 8 zur Komplementierung der Funktion von endogenen, viralen Vpr in Zellkulturen, die mit vpr-defizienten HIV-Mutanten infiziert sind.

18. Verwendung nach Anspruch 7, 8 und 17 zur Komplementierung der Funktion von viralem
20 Vpr in Kulturen von primären humanen Lymphozyten, die mit vpr-defizienten HIV-Mutanten infiziert sind.

19. Verwendung nach Anspruch 7, 8, 17 und 18 zur Komplementierung der Funktion von viralen
Vpr in Kulturen von ausdifferenzierten primären humanen Monozyten / Makrophagen, die mit
25 vpr-defizienten HIV-Mutanten infiziert sind.

20. Verwendung nach Anspruch 7 bis 19 zur Bestimmung von Reagenzien, die

a) die Wechselwirkung von Vpr mit zellulären Faktoren, wie zum Beispiel mit dem
30 Glucocorticoid-Rezeptor, Transkriptionsfaktoren und anderen DNA-interagierenden Enzymen und Faktoren unterbinden;

b) die Transkriptions-aktivierende Wirkung von Vpr verhindern;

die Aktivität von Vpr auf die Wirkung von Steroidhormone regulieren, beeinflussen oder verhindern;

c) den Transport von Vpr allein oder im Verbund mit anderen Komponenten des HIV-Präintegrationskomplexes regulieren, beeinflussen oder verhindern;

den Einbau von Vpr in Viruspartikel während der HIV-Assemblierung regulieren, beeinflussen oder verhindern;

5 d) den Vpr-induzierten Zellzyklusarrest regulieren, beeinflussen oder verhindern

den Effekt von Vpr auf Zelldifferenzierung und Zellwachstum regulieren, beeinflussen oder verhindern

e) die zytotoxischen Effekte von Vpr regulieren, beeinflussen oder verhindern

f) die Ionenkanalaktivität von Vpr regulieren, beeinflussen oder verhindern

10

21. Verwendung von sVpr-Proteinen nach Anspruch 7 und 8 für in vivo Testsysteme zur Bestimmung von Vpr-Antagonisten.

22. Verwendung von sVpr-Proteinen nach Anspruch 7 und 8 in Tiermodellstudien zur

15 Bestimmung von Funktionen nach Anspruch 20.

23. Verwendung von sVpr-Proteinen nach Anspruch 7 und 8 zur Herstellung konzentrierter Peptid-Lösungen.

20 24. Verwendung von sVpr-Proteinen nach Anspruch 7, 8 und 23 zur Herstellung spezifischer Vpr-Antagonisten.

25 25. Verwendung von sVpr-Proteinen nach Anspruch 7, 8, 21 und 24 zur Reduktion der durch die N-terminale Domäne von Vpr induzierten Flexibilität von sVpr-Protein mittels strukturstabilisierenden Faktoren.

26. Verwendung nach Anspruch 25, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei den strukturstabilisierenden Faktoren um

a) die UBA2-Domäne des DNA-Reparaturproteins HHR23A, welches an Vpr bindet,

30 b) Fab-Fragmente von Vpr-spezifischen Immunglobulinen oder

c) virale Faktoren, insbesondere Komponenten des HIV-1 Gag-Polyproteinprecursurs Pr55Gag, welche im Prozess der Virus-Assemblierung mit Vpr in Verbindung treten oder

d) dem humanen Glucocorticoidrezeptor oder Bestandteile davon handelt.

35

27. Verwendung von sVpr-Proteinen nach Anspruch 7 für in vitro Assemblierung von retroviralen Präintegrationskomplexen.

28. Verwendung von sVpr-Proteinen nach Anspruch 7, 8 und 27 in in vitro oder in vivo
5 applizierbaren Gentransfermethoden.

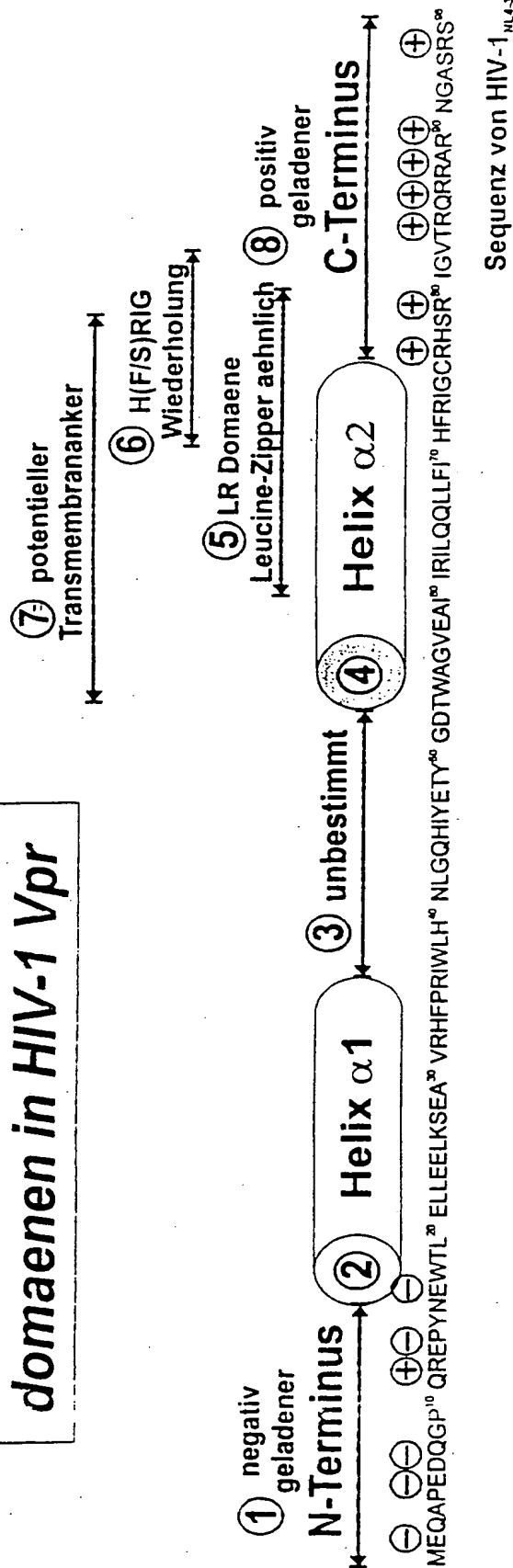
29. Verwendung von sVpr-Proteinen nach Anspruch 7, 8 und 28 für Transfektionen. Integration in chromosomale und episomale Wirts-DNA oder andere Gentransfermethoden in eukaryotischen Zellen.

10

30. Verwendung von sVpr-Proteinen nach Anspruch 7, 8 und 28 für Gentransfers von in vitro hergestellter und/oder manipulierter Genfragmente in Zellen, Gewebe oder Organismen mit dem Zweck einer gentherapeutischen Applikation.

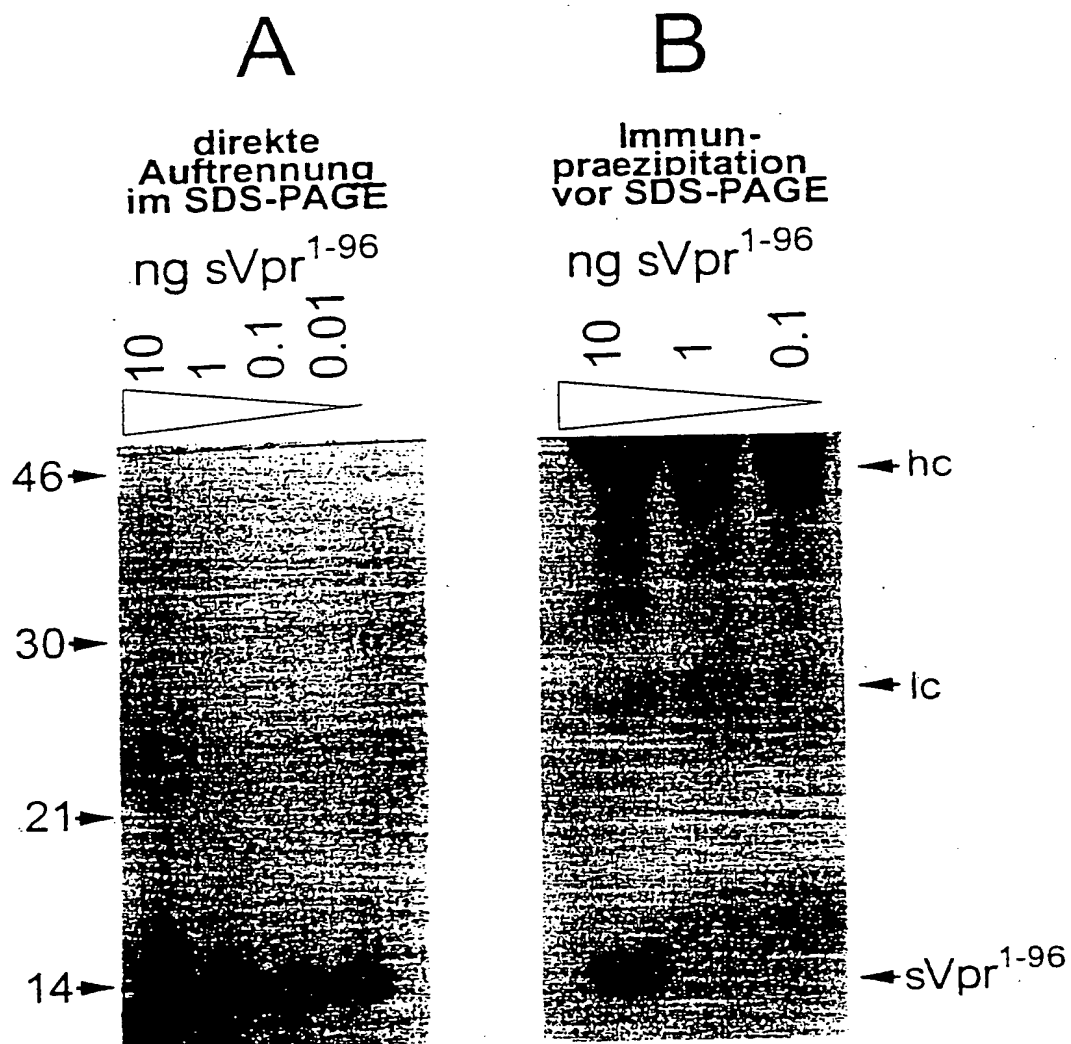
gur 1

Struktur- und Funktionsdomaenen in HIV-1 Vpr

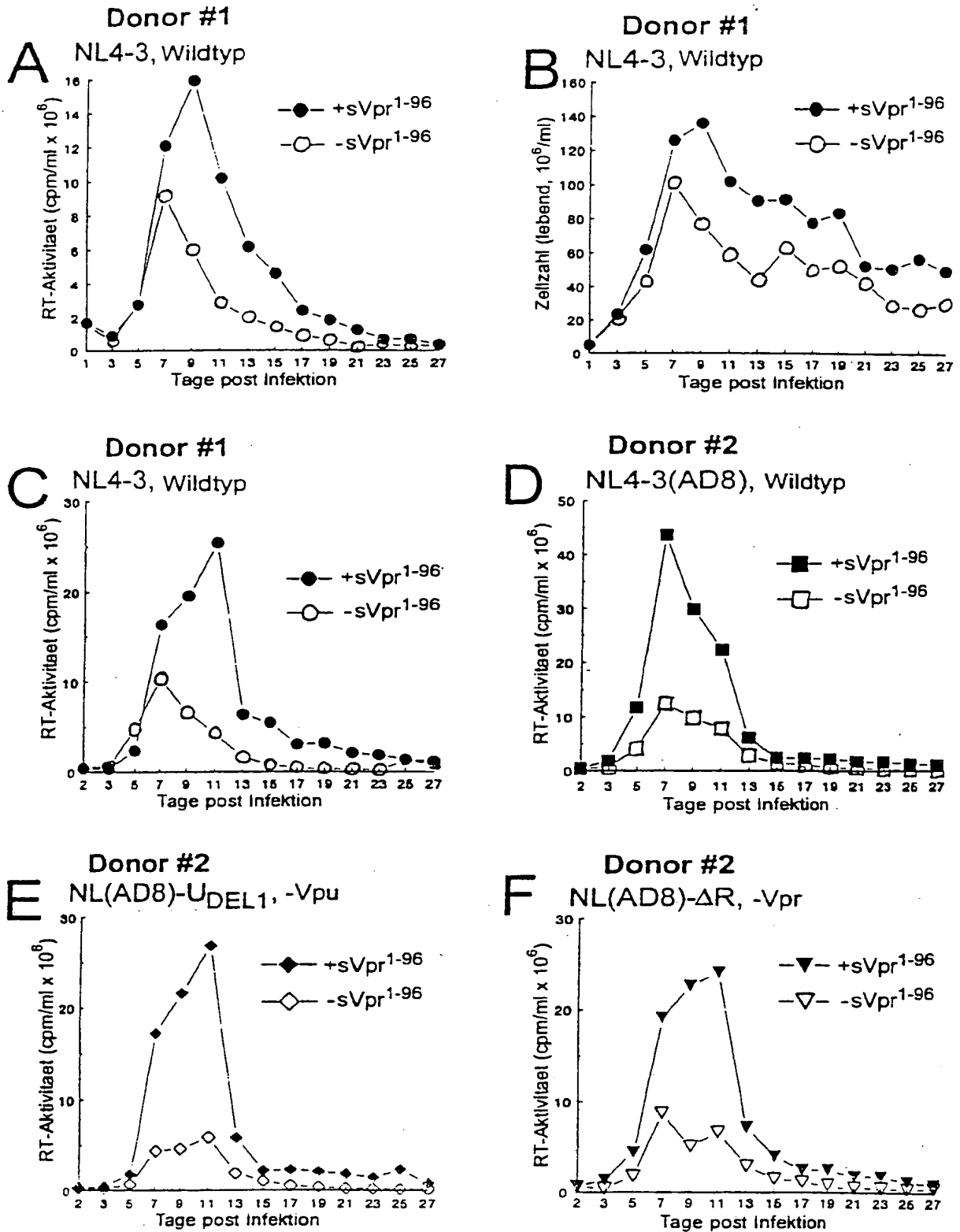


Domaene	Funktionen
② ④	Einbau von Vpr in Viruspartikel
② ④ ⑤	Transport in Zellkern
② ② ④	Zellzyklus-Arrest/Zelldifferenzierung
① ② ③	Oligomerisierung
⑥ ⑧	Zytotoxizität und Induktion von Apoptosis
④ ⑧	Ionenkanalaktivität
⑤ ⑧	Transkriptionsaktivierung & Interaktion mit Sp1
④ ⑤	Regulation des Glucocortikoidrezeptors

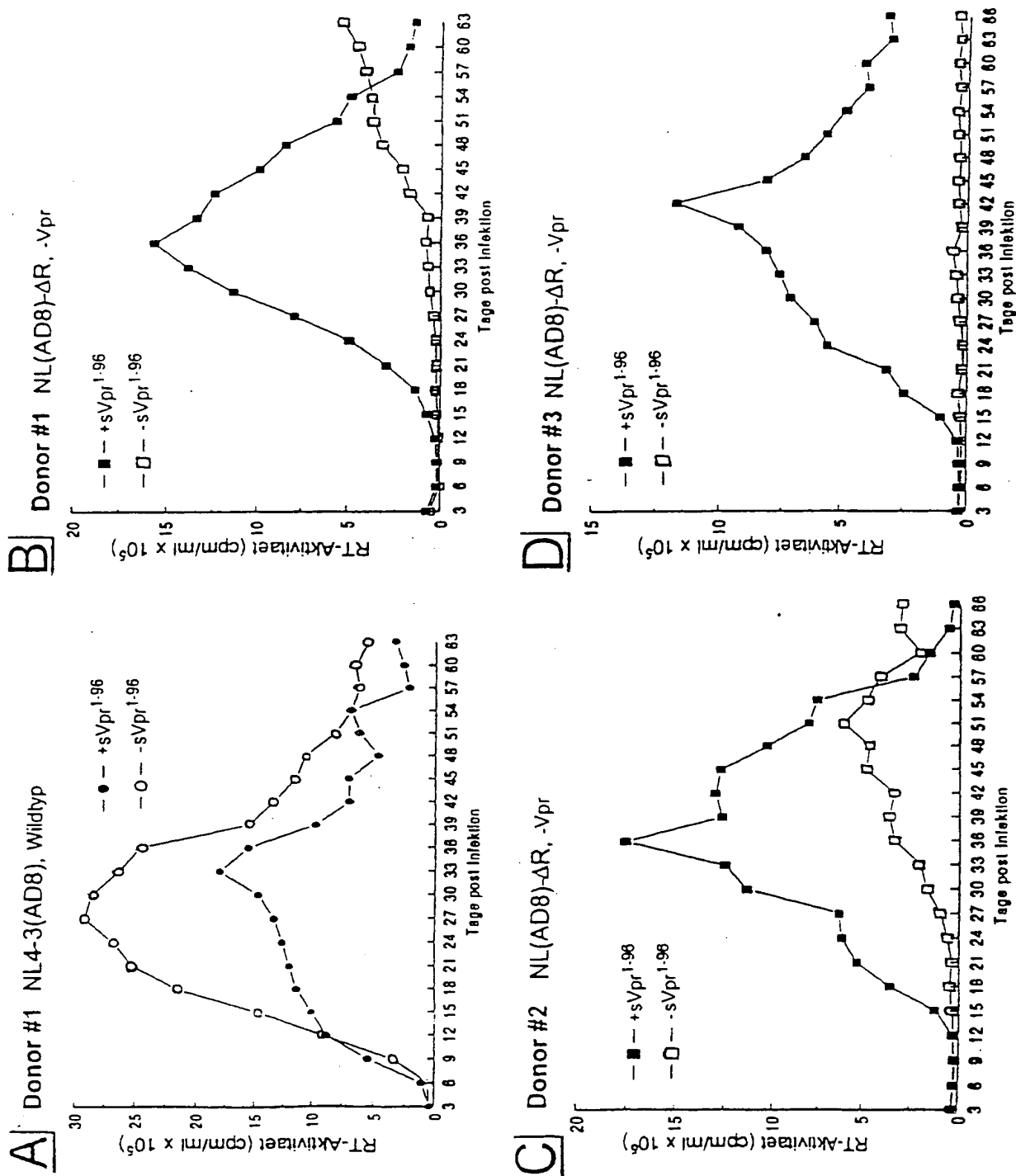
Figur 2



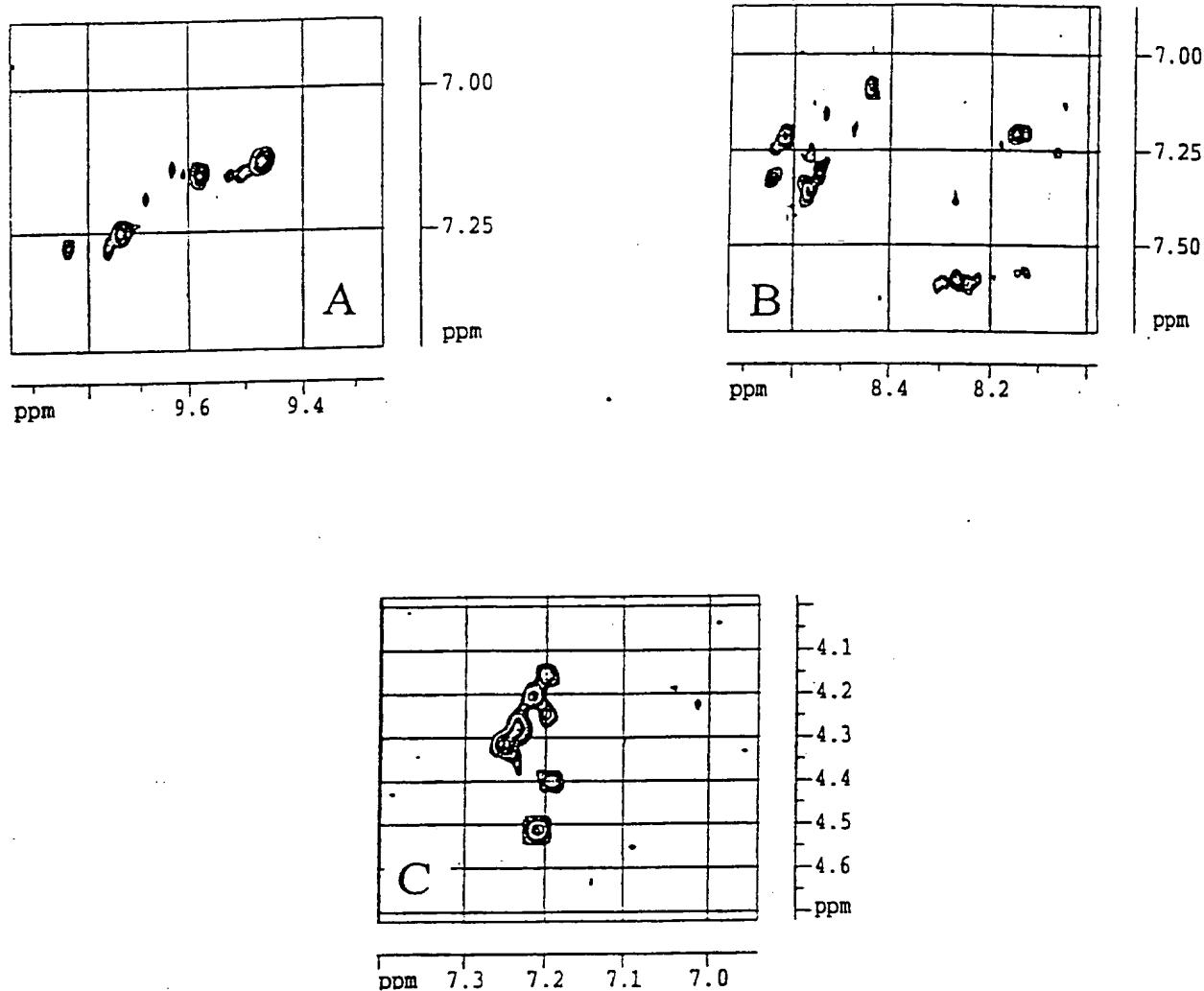
Figur 3



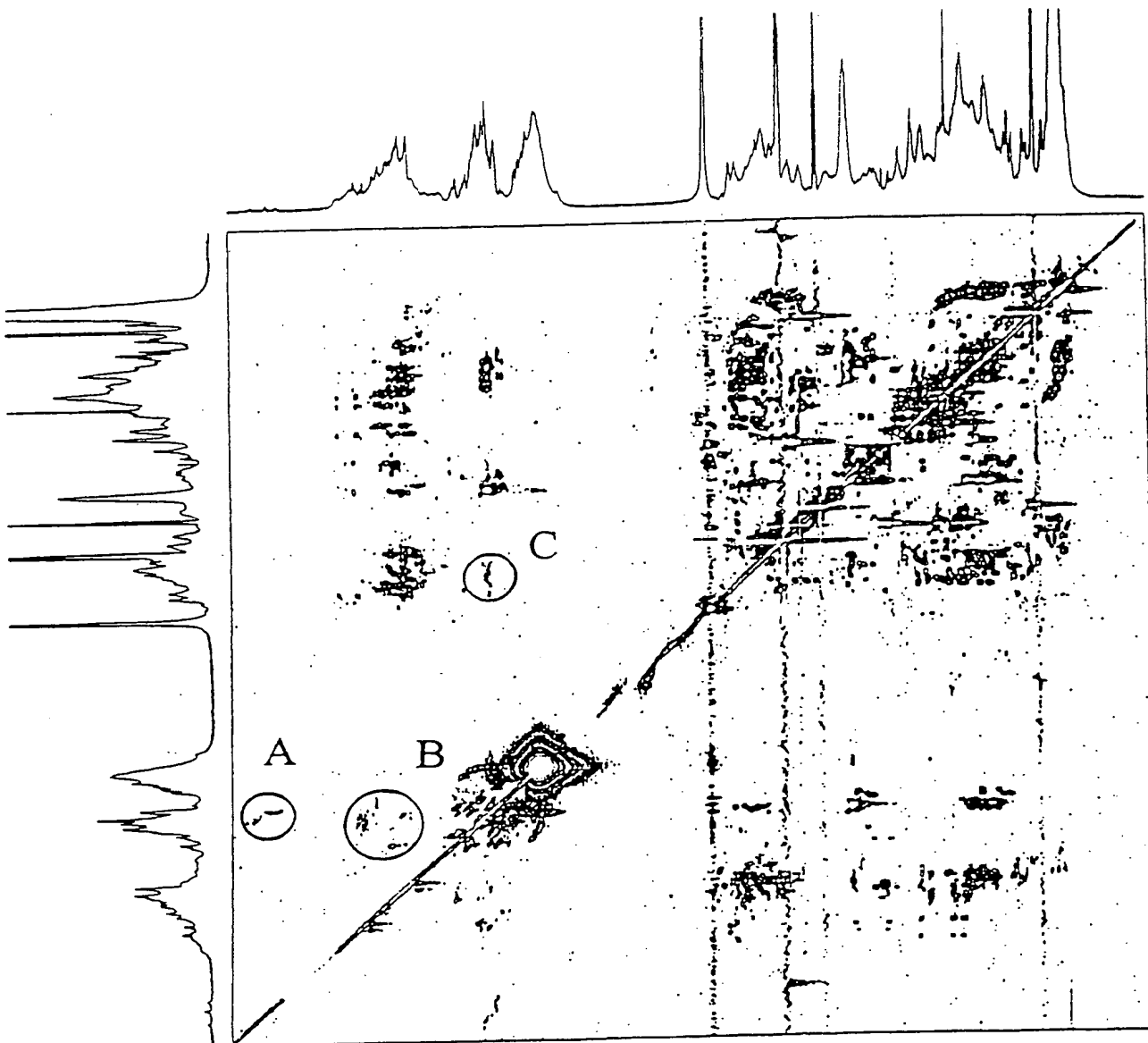
Figur 4



Figur 5

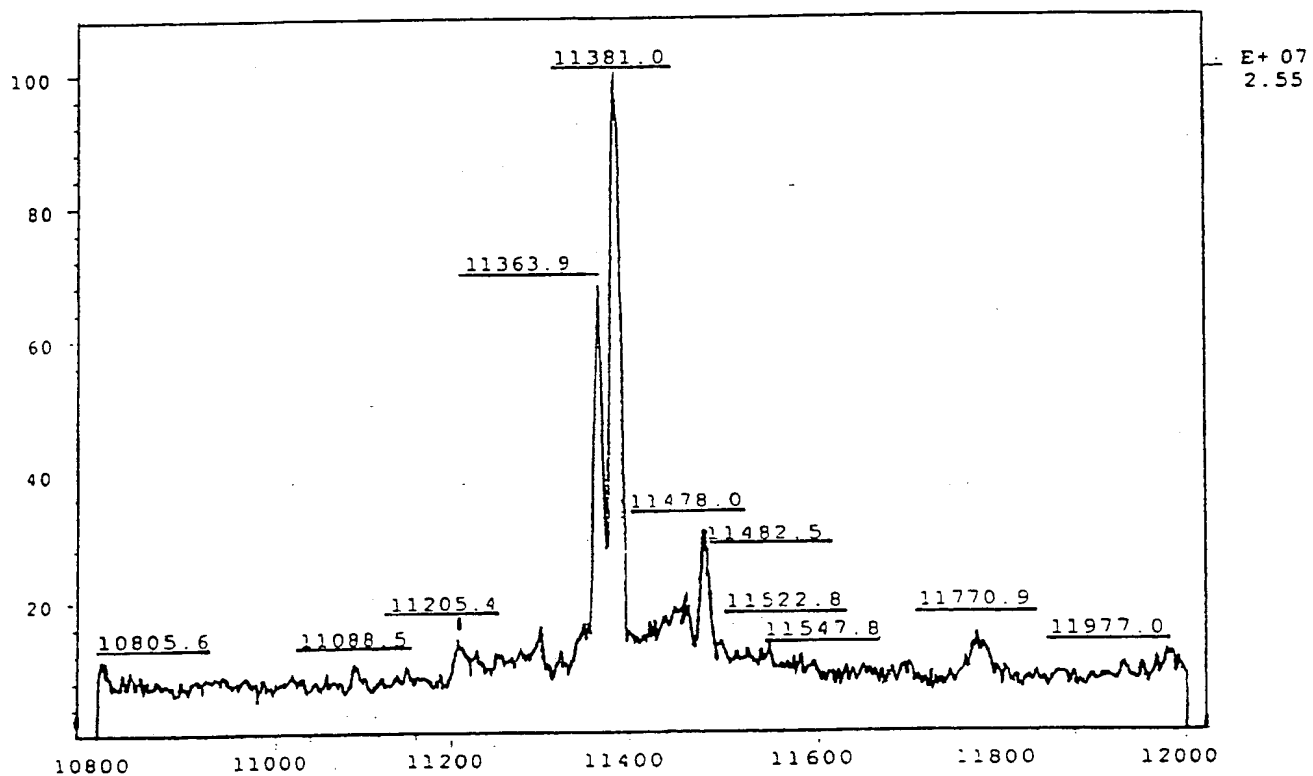
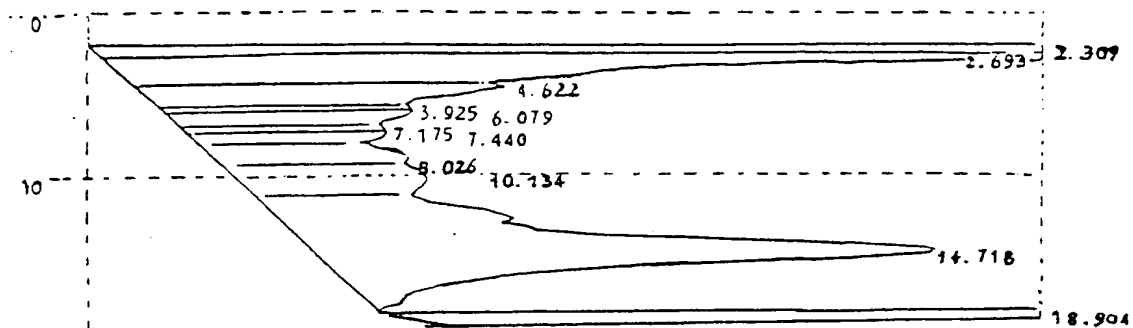


Figur 6



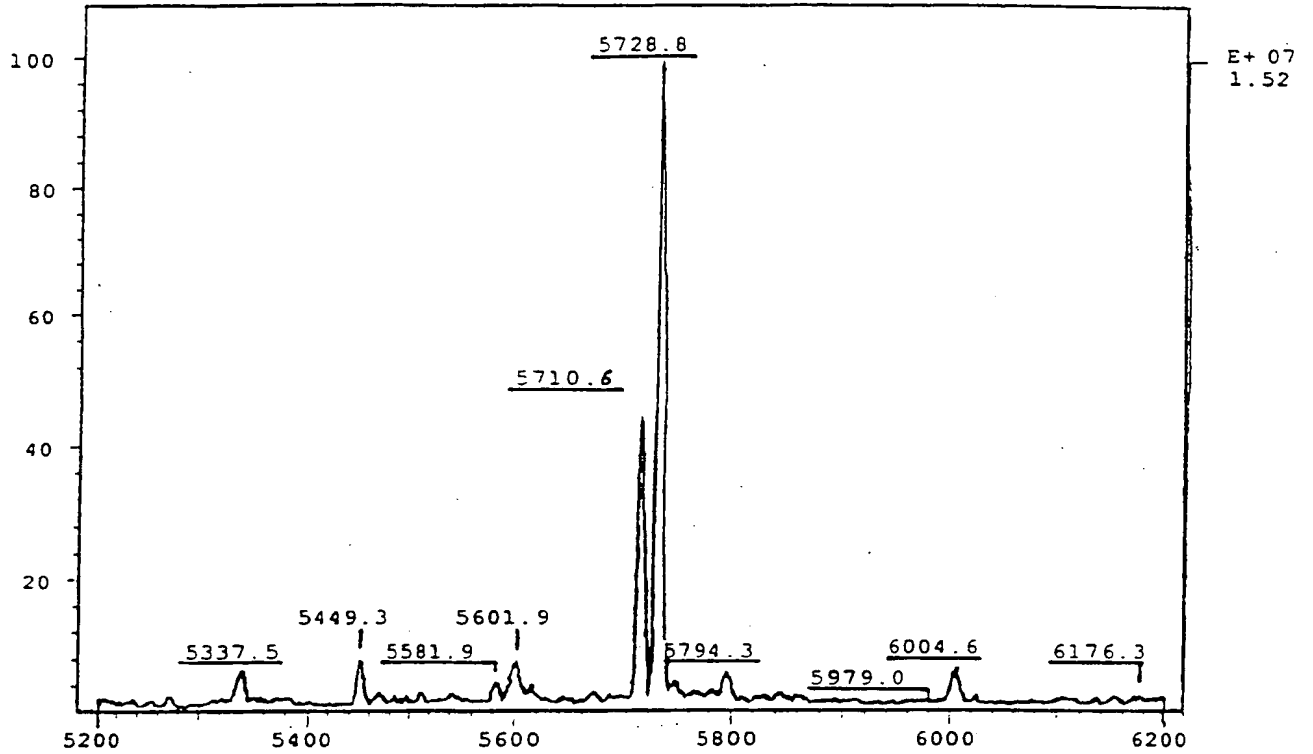
7/10

Figur 7

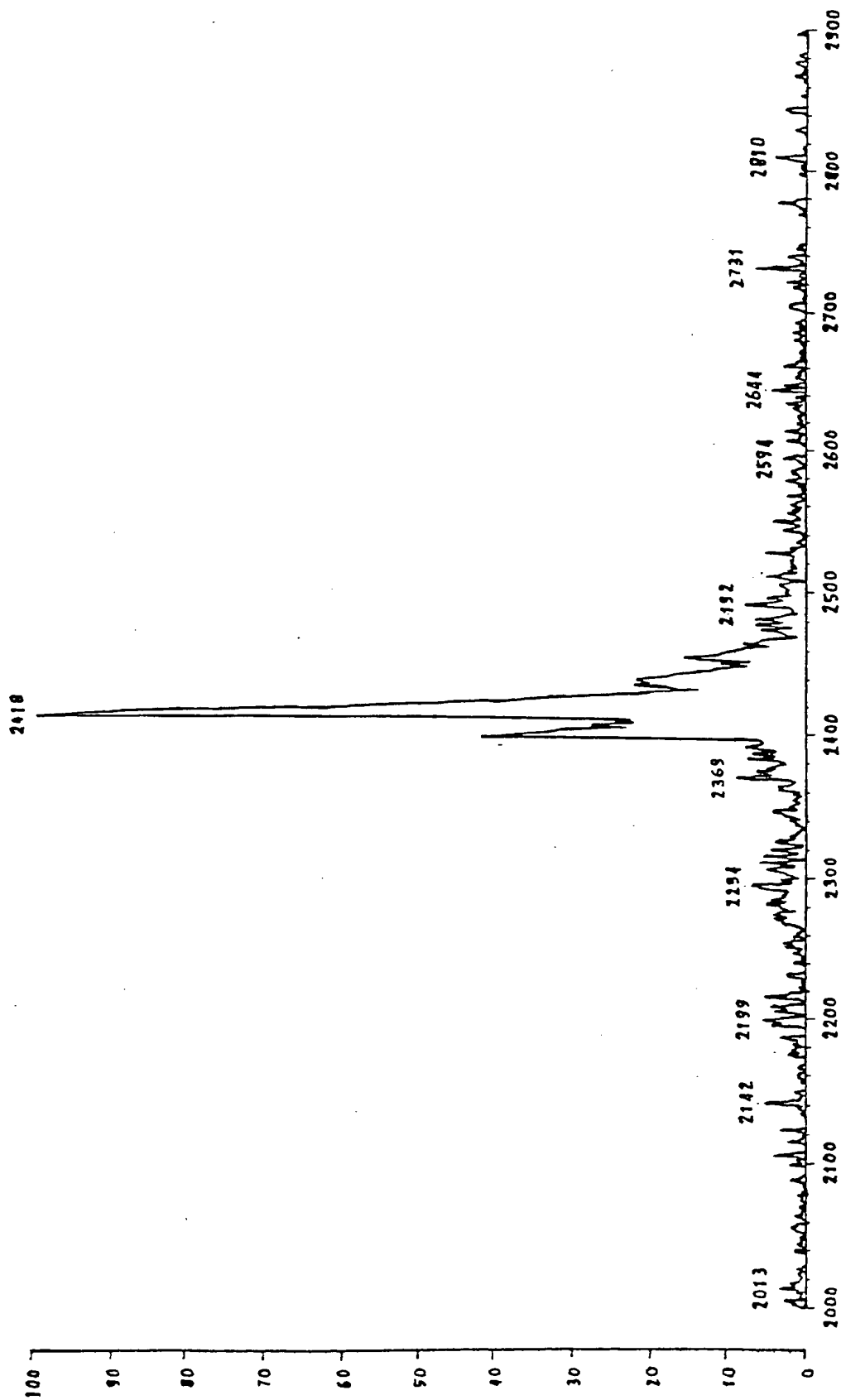


Figur 8

8/10

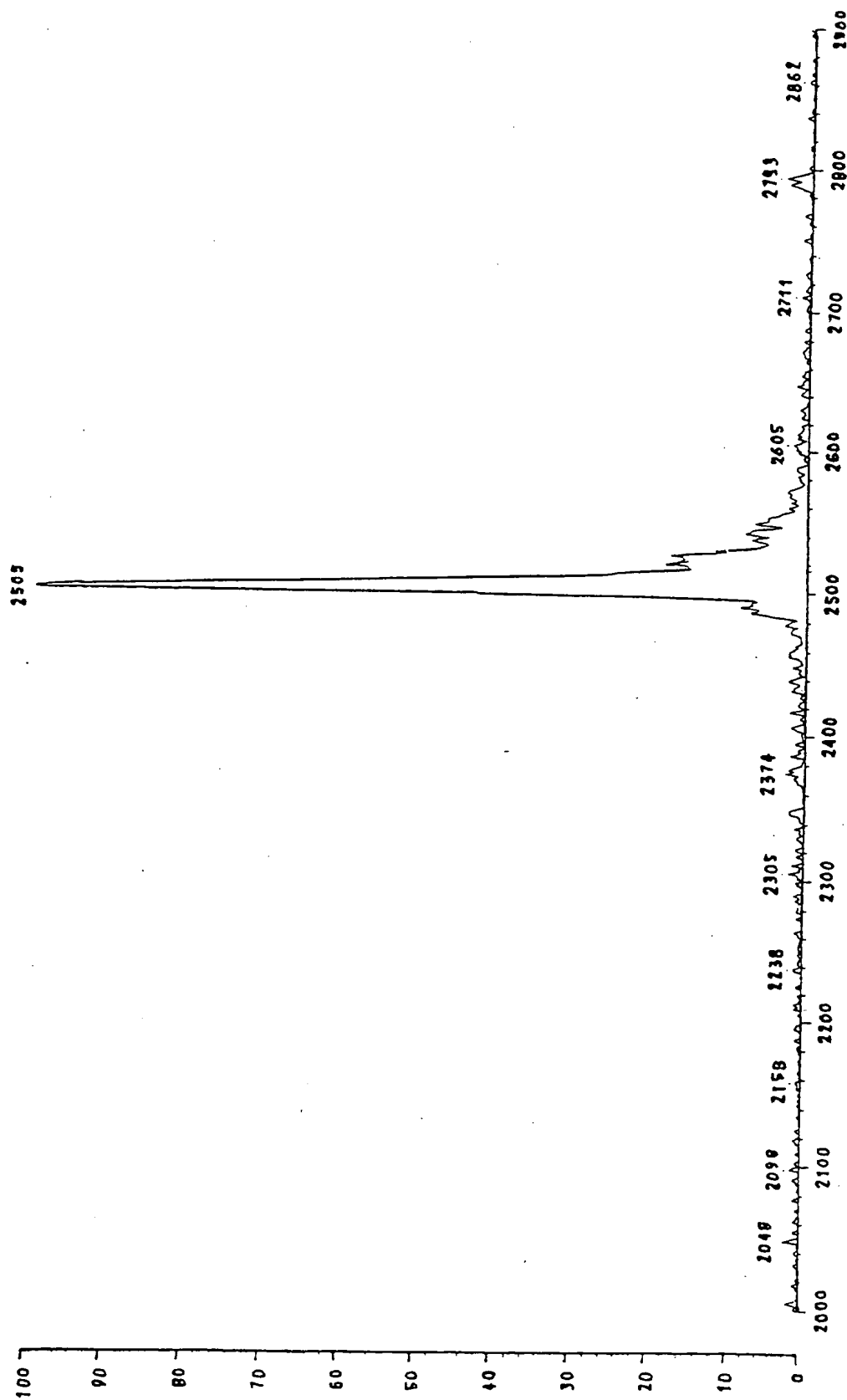


Figur 9



10/10

Figur 10



(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
24. August 2000 (24.08.2000)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 00/49038 A3

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: C07K 14/16,
G01N 33/68, C07K 16/10, A61P 31/18

(DE). WRAY, Victor [GB/DE]; Elbinger Strasse 6,
D-38302 Wolfenbüttel (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE00/00525

(74) Anwalt: WEHLAN, Helmut; Paul-Gesche-Strasse 1,
D-10315 Berlin (DE).

(22) Internationales Anmeldedatum:
19. Februar 2000 (19.02.2000)

(81) Bestimmungsstaaten (national): JP, US.

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(84) Bestimmungsstaaten (regional): europäisches Patent (AT,
BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC,
NL, PT, SE).

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

Veröffentlicht:

— Mit internationalem Recherchenbericht.

(30) Angaben zur Priorität:
199 08 752.0 19. Februar 1999 (19.02.1999) DE
199 08 766.0 19. Februar 1999 (19.02.1999) DE

(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen
Recherchenberichts: 1. März 2001

(71) Anmelder und

(72) Erfinder: SCHUBERT, Ulrich [DE/DE]; Jenaische
Strasse 51, D-07407 Uhlstädt (DE). HENKLEIN, Peter
[DE/DE]; Schulze-Boysen-Strasse 25, D-10365 Berlin

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe
der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: SYNTHETIC PEPTIDE OF REGULATORY VIRUS PROTEIN R (VPR) OF HUMAN IMMUNODEFICIENCY VIRUS
TYPE 1 (HIV-1) AND THE UTILIZATION THEREOF

(54) Bezeichnung: SYNTHETISCHE PEPTIDE DES REGULATORISCHEN VIRUSPROTEINS R (VPR) DES HUMANEN IM-
MUNDEFIZIENZVIRUS TYP 1 (HIV-1) UND IHRE VERWENDUNG

(57) Abstract: The invention relates to synthetic (s) peptides of regulatory virus protein R (Vpr) of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1), especially the total chemical synthesis of 96 aminoacid long Vpr protein (sVpr1-96), a 47 aminoacid long N terminal fragment (sVpr1-47) and a 49 aminoacid long C terminal fragment thereof (sVpr48-96) and to fragments sVpr1-20 and sVpr21-40, in addition to other fragments with approximately 15 aminoacids. Said products are used as HIV-1 regulatory proteins in biological assays and in the analysis of molecular structure and physico-chemical properties of Vpr and its domains or in the production of antibodies directed against Vpr-peptide sequences.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft synthetische (s) Peptide des regulatorischen Virusproteins R (Vpr) des Humanen Immundefizienzvirus Typ 1 (HIV-1), insbesondere die chemische Totalsynthese des 96 Aminosäuren langen Vpr-Proteins (sVpr1-96), eines 47 Aminosäuren langen N-terminalen (sVpr1-47), eines 49 Aminosäuren langen C-terminalen Fragmentes davon (sVpr48-96) sowie der Fragmente sVpr1-20 und sVpr21-40 und weiterer Fragmente mit etwa 15 Aminosäuren. Als HIV-1-regulatorische Proteine finden die Produkte Verwendung in biologischen Assays, in der Analyse der molekularen Struktur und der physikochemischen Eigenschaften von Vpr und dessen Domänen oder zur Erzeugung von Antikörpern gegen Vpr-Peptidsequenzen.

WO 00/49038 A3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. Journal Application No

PCT/DE 00/00525

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C07K14/16 G01N33/68 C07K16/10 A61P31/18

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C07K G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

BIOSIS, EPO-Internal, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>WO 98 44945 A (IMMUNE RESPONSE CORP INC) 15 October 1998 (1998-10-15)</p> <p>page 9, line 1 - line 4; claims 24-27 page 15, line 29 -page 16, line 9</p>	1,2,7,8, 10-12, 25,26
X	<p>WO 95 26361 A (BIOMOLECULAR RES INST LTD ;AZAD AHMED A (AU); MACREADIE IAN G (AU)) 5 October 1995 (1995-10-05)</p> <p>page 3, line 1 - line 26 page 4, line 6 -page 5, line 10 page 6, line 16 - line 20; claims; example 6</p> <p style="text-align: center;">— -/-</p>	1,2,4,7, 8,12,16, 19

X Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

* "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

***&** document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

Date of mailing of the international search report

28 August 2000

15/09/2000

Name and mailing address of the ISA
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040. Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Fuhr, C

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intentional Application No

PCT/DE 00/00525

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>DATABASE BIOSIS 'Online! BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; 5 February 1999 (1999-02-05) SCHULER W ET AL: "NMR structure of the (52-96) C-terminal domain of the HIV-1 regulatory protein Vpr: Molecular insights into its biological functions." Database accession no. PREV199900140755 XP002145860 abstract & JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, vol. 285, no. 5, 5 February 1999 (1999-02-05), pages 2105-2117, ISSN: 0022-2836</p>	1,2
P,X	<p>DATABASE BIOSIS 'Online! BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; November 1999 (1999-11) CORNILLE F ET AL: "Efficient solid-phase synthesis of Vpr from HIV-1 using low quantities of uniformly ¹³C-, ¹⁵N-labeled amino acids for NMR structural studies." Database accession no. PREV200000001193 XP002145861 abstract & JOURNAL OF PEPTIDE RESEARCH, vol. 54, no. 5, November 1999 (1999-11), pages 427-435, ISSN: 1397-002X</p>	1,2
P,X	<p>DATABASE BIOSIS 'Online! BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; December 1999 (1999-12) WECKER K ET AL: "NMR structure of the (1-51) N-terminal domain of the HIV-1 regulatory protein Vpr." Database accession no. PREV200000048307 XP002145862 abstract & EUROPEAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY, vol. 266, no. 2, December 1999 (1999-12), pages 359-369, ISSN: 0014-2956</p>	1,2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/DE 00/00525

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>Z. LUO ET AL.: "Structural Studies of Synthetic Peptide Fragments Derived from the HIV-1 Vpr Protein"</p> <p>BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS,</p> <p>vol. 244, no. 3,</p> <p>27 March 1998 (1998-03-27), pages 732-736,</p> <p>XP002145859</p> <p>ORLANDO, FL US</p> <p>page 734, right-hand column, paragraph 1; figure 1</p>	1,2,7,8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/DE 00/00525

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO 9844945	A	15-10-1998	AU	7101798 A	30-10-1998
WO 9526361	A	05-10-1995	AU	697620 B	15-10-1998
			AU	2063495 A	17-10-1995
			CA	2186398 A	05-10-1995
			EP	0753006 A	15-01-1997
			JP	9511395 T	18-11-1997

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1992)

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Int. Nationales Aktenzeichen

PCT/DE 00/00525

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
 IPK 7 C07K14/16 G01N33/68 C07K16/10 A61P31/18

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C07K G01N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

BIOSIS, EPO-Internal, WPI Data

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 98 44945 A (IMMUNE RESPONSE CORP INC) 15. Oktober 1998 (1998-10-15) Seite 9, Zeile 1 - Zeile 4; Ansprüche 24-27 Seite 15, Zeile 29 - Seite 16, Zeile 9	1,2,7,8, 10-12, 25,26
X	WO 95 26361 A (BIOMOLECULAR RES INST LTD ;AZAD AHMED A (AU); MACREADIE IAN G (AU)) 5. Oktober 1995 (1995-10-05) Seite 3, Zeile 1 - Zeile 26 Seite 4, Zeile 6 - Seite 5, Zeile 10 Seite 6, Zeile 16 - Zeile 20; Ansprüche; Beispiel 6 -/-	1,2,4,7, 8,12,16, 19

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

Z Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

28. August 2000

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

15/09/2000

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde
 Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
 Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Beauftragter

Fuhr, C

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Int: Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 00/00525

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	<p>DATABASE BIOSIS 'Online! BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; 5. Februar 1999 (1999-02-05) SCHULER W ET AL: "NMR structure of the (52-96) C-terminal domain of the HIV-1 regulatory protein Vpr: Molecular insights into its biological functions." Database accession no. PREV199900140755 XP002145860 Zusammenfassung & JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, Bd. 285, Nr. 5, 5. Februar 1999 (1999-02-05), Seiten 2105-2117, ISSN: 0022-2836</p>	1,2
P,X	<p>DATABASE BIOSIS 'Online! BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; November 1999 (1999-11) CORNILLE F ET AL: "Efficient solid-phase synthesis of Vpr from HIV-1 using low quantities of uniformly ¹³C-, ¹⁵N-labeled amino acids for NMR structural studies." Database accession no. PREV200000001193 XP002145861 Zusammenfassung & JOURNAL OF PEPTIDE RESEARCH, Bd. 54, Nr. 5, November 1999 (1999-11), Seiten 427-435, ISSN: 1397-002X</p>	1,2
P,X	<p>DATABASE BIOSIS 'Online! BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; Dezember 1999 (1999-12) WECKER K ET AL: "NMR structure of the (1-51) N-terminal domain of the HIV-1 regulatory protein Vpr." Database accession no. PREV200000048307 XP002145862 Zusammenfassung & EUROPEAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY, Bd. 266, Nr. 2, Dezember 1999 (1999-12), Seiten 359-369, ISSN: 0014-2956</p>	1,2
	-/-	

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Int: ionales Aktenzeichen

PCT/DE 00/00525

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	<p>Z. LUO ET AL.: "Structural Studies of Synthetic Peptide Fragments Derived from the HIV-1 Vpr Protein"</p> <p>BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS,</p> <p>Bd. 244, Nr. 3,</p> <p>27. März 1998 (1998-03-27), Seiten 732-736, XP002145859</p> <p>ORLANDO, FL US</p> <p>Seite 734, rechte Spalte, Absatz 1; Abbildung 1</p>	1,2,7,8

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Int. ionales Aktenzeichen

PCT/DE 00/00525

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
WO 9844945	A	15-10-1998	AU	7101798 A	30-10-1998
WO 9526361	A	05-10-1995	AU	697620 B	15-10-1998
			AU	2063495 A	17-10-1995
			CA	2186398 A	05-10-1995
			EP	0753006 A	15-01-1997
			JP	9511395 T	18-11-1997